平成 22 年度
両生類の新興感染症実態調査業務
報告書

平成 23 年３月

環境省自然環境局野生生物課

要約

１．目的

本業務は、ラナウイルス症等の両生類等の新興感染症が国内の両生類等へ与える影響やその軽減に必要な措置等に関する知見を収集することを目的とし、国内の両生類等におけるラナウイルス症の感染状況を把握するための調査や、文献調査及び専門家ヒアリング調査を実施した。また、得られた情報に基づき、一般向けのホームページと、担当者向けのマニュアルを作成した。

２．ラナウイルスの感染が懸念される両生類等サンプルの検査

平成 21 年９月に両生類及び魚類の集団死が発生していた場所を主な対象として、平成 22 年６～11 月に同地に生息する両生類及び魚類についてラナウイルスＤＮＡの計画的な採取・検査を行い、同ウイルスの感染状況を調べた。その結果、検査した両生類 197 個体（生存個体 189 個体、死亡個体８個体）及び魚類 183 個体（生存個体 181 個体、死亡個体２個体）のうち、両生類 11 個体においてラナウイルスへの感染が確認された。その内訳は、ウシガエル 10 個体（生存幼生５、死亡幼生４、生存幼体１）とニホンアマガエル１個体（死亡成体１）であった。

季節変化を追うと、６月以降ラナウイルス感染個体が低頻度に確認され、９月下旬には感染率が最大に達した。９月下旬から 10 月中旬にはウシガエル幼生等の集団死（数千～１万個体程度）が認められたが、この集団死の発生が収束した後は、感染個体は確認されなかった。一方、希少種も含め魚類の感染については一切認められず、集団死も確認されなかった。

なお、同じ場所で平成 21 年 10～12 月に採取された両生類及び魚類の計 20 個体（生存個体３個体、死亡個体 14 個体、生死不明個体２個体）についてもＤＮＡの検査を行ったが、ラナウイルスの感染は認められなかった。

３．両生類等の感染症に関する知見の取りまとめ

①両生類等の感染症に関するヒアリング

ラナウイルス症をはじめとする両生類等の新興感染症や両生類の保全に関する知見を収集するため、病理学、感染症学、両生類学、獣医学等の専門家４名にヒアリングを行った。ヒアリング内容は、主に以下の項目について情報を収集した。

- ラナウイルス症等の両生類感染症の実態（生物学的特性、感染症としての特性、野外での発生事例、検査方法、消毒方法、その他必要な対策）
- 両生類保全のための感染症対策（カエルツボカビ症関連の過去の事業への評価、在来の両生類に対する新興感染症のリスク、必要な体制）

②両生類の感染症に関する文献調査等

ラナウイルス症等を中心とする両生類の新興感染症の海外における発生事例や必要な対策及び体制等の情報を平成 22 年度出版の学術論文から収集して取りまとめた。また、（独）国立環境研究所が GIS 解析を用いた生態ニッチモデリングによりカエルツボカビの空間的侵入リスクを評価した研究結果について、取りまとめた。

４．両生類の感染症に関する知見の取りまとめ

これまで集積してきたカエルツボカビ症及びラナウイルス症に関する知見をとりまとめ、これらの新興感染症が両生類に与え得る影響及びその軽減のために必要な措置について、一般向けのウエブページ（ＨＴＭＬ）を作成した。また、両生類の集団死等が発生したときの対応について、行政担当者向けにマニュアルを作成した。同マニュアルでは、「事前準備」、「状況確認」、「検体回収、死体処分及び希少種保護」及び「検査後対応」の段階について、集団死発生現場における対応について、技術的な観点から取りまとめた。

New and emerging infectious diseases on amphibians in Japan: a status report in fiscal 2010
Exclusive summary

1. Objectives

This project aims at collecting knowledge and information with regard to the impact of such new and emerging infectious diseases like *ranavirus* disease on amphibians and other animals, and necessary measures to reduce such impact. We conducted a survey on infection status of *ranavirus* disease among amphibians and other animals in Japan, in addition to literature research and interviews with experts in this field. Based on the information obtained, we developed a web site for the public as well as a manual for relevant officials.

2. *Ranavirus* infection test of amphibians

From June to November, 2010, we conducted *ranavirus* infection tests for amphibian and fish species mainly at sites where mass death of amphibian or fish species had been reported, under systematic DNA sampling process. We tested 197 amphibians (189 live individuals and 8 dead individuals) and 183 fish (181 live individuals and 2 dead individuals) and the result showed that 11 amphibian individuals were confirmed to be infected with *ranavirus*: ten American bull frogs (five live larvae, four dead larvae, and one live juvenile) and one Japanese tree frog (one dead adult).

Focusing of seasonal change reveals that *ranavirus* infection started to be confirmed with low frequency beginning with June and infection rates hit its peak in late September, followed by mass deaths (ranging from several thousand to ten thousand individuals) of American bull frog larvae and others during late September to mid-October. No infected individuals were confirmed after the end of the mass death occurring. Furthermore, no *ranavirus* infection was confirmed in 20 amphibian or fish individuals (3 live individuals, 14 dead individuals, and 2 unknown individuals) collected during October to December, 2009, at the sites where mass deaths had occurred.

3. Compilation of knowledge and information about infectious diseases of amphibians and other animals

1) Interviews with experts

For the purpose of collecting knowledge and information about new and emerging infectious diseases in amphibians and other animals such as *ranavirus* diseases,

as well as knowledge and information on the conservation of amphibians, we conducted interviews with four experts of pathology, infectious diseases, batrachology, and veterinary medicine. The interviews focused mainly on the following items:

- the picture of amphibian infectious diseases such as *ranavirus* diseases (biological property, characteristic features as infectious diseases, infection cases in the field, diagnostic procedures, disinfection method, and other necessary counter measures)
- counter measures against infectious diseases for the conservation of amphibians (review and assessment of past programs related to amphibian *chytridmycosis*, risk assessment of new and emerging infectious diseases for native amphibians, and necessary framework for the conservation)

2) Literature research on amphibian infectious diseases

We collected and organized information from scientific papers published in fiscal 2010 on overseas cases of, and necessary countermeasures and frameworks against new and emerging amphibian infectious diseases like *ranavirus* disease. We also summarized the result of spatial risk assessment of amphibian *chytridmycosis* invasion through an ecological niche modeling using GIS analysis.

4. Collecting and organizing information on infectious diseases in amphibians

Based on the information obtained on amphibian *chytridmycosis* and *ranavirus* diseases, we developed a web site for the public concerning the impact of these new and emerging infectious diseases on amphibians and necessary measures to reduce such impact. We also developed a countermeasure manual for officials in case of amphibian mass death occurrence. This manual provides technical aspects of how to address amphibian mass death cases at each stage of "prior arrangement", "status verification", "specimen collection, carcass disposal, and the conservation of rare species", and "site monitoring after the test."

目次

第１章　調査の背景と目的

地球上に生息する両生類（カエル、サンショウウオ、イモリなど）のうち、122 種以上が 1980 年以降に絶滅したと推測され、現存する 6000 種近くの両生類のうち 32％は、絶滅のおそれがあるとされている（Stuart et al., 2004)。カエルツボカビ症は、両生類にこのような急激な減少や絶滅を引き起こしている要因の一つと考えられており、またラナウイルス症も両生類の地域的な集団死を引き起こしていることが分かっている。現在、カエルツボカビ症とラナウイルス症は、ＯＩＥ（国際獣疫事務局）の対象疾病に、またカエルツボカビ症はＩＵＣＮ（国際自然保護連合）の外来生物ワースト 100 にもそれぞれ掲載されているなど、世界的な監視が必要とされている感染症でもある。

我が国では平成 18 年にカエルツボカビ症が、平成 20 年にラナウイルス症が、両生類に感染していることが初めて確認された。環境省では、平成 19 年度からカエルツボカビ症を主な対象として、国内の両生類の感染状況を調べるとともに、国内外のカエルツボカビ症の現状や研究の進捗状況について、情報を収集してきた。しかし、ラナウイルス症については、国内の感染実態や両生類に対する影響は、未だ明らかになっていないことが多く残されている。

本業務では、ラナウイルス症等の新興感染症について、国内両生類における感染実態の調査を実施するとともに、その結果や最新の文献等から得られた知見を取りまとめることを目的とした。

第２章　ラナウイルスの感染が懸念される両生類等サンプルの検査

１．ラナウイルス症確認地域における感染状況把握調査

（１）目的

世界各地で両生類等の集団死を引き起こす原因の一つと考えられるラナウイルス症は、国内では平成 20 年に初めて野外で確認された。西日本の農業用水用のため池でウシガエルの集団死が発生した際にその死体から検出されたもので、ウシガエルの集団死はこのウイルスへの感染が原因として疑われている。平成 21 年度中には、集団死を起こしたウシガエルの死体からラナウイルスが検出される事例は、国内の地地域でも知られている。

ラナウイルス症は、海外で両生類等の集団死を引き起こす事例が知られているが、国内の両生類等への影響や感染状況についてはわかっていないことが多い。本業務では、国内の両生類等における野外でのラナウイルス症の感染状況について基礎的な情報を得ることを目的とし、過去にラナウイルスが確認されている地域の両生類等の感染率を調べた。

（２）方法

１）調査場所

本調査では、過去にラナウイルス症によると思われる両生類幼生の集団死の発生記録がある場所をサンプル採集の主対象とした。サンプル採集の対象地とした西日本の３つの場所それぞれの現地作業実施日を表２－１に示す。

平成 21 年度にウシガエル幼生の集団死が発生した調査地①では、平成 22 年度も 9 月 28 日の現地調査の際に、多数のウシガエル幼生の死体が確認された。死体を放置した場合は、それ自体が感染源となって健全個体の感染を招くおそれがあることから、当日は通常のサンプル採集に加えて、併せて死体の回収も行った。

集団死の発生については速やかに環境省の地方環境事務所や地元自治体、専門家に連絡し、その後の対応について協議した。その結果、当面の対応としては死体の回収が重要と考えられたため、集団死が続くうちは、同場所で両生類や魚類等の死体を回収し、適切な方法で処分することとした。この一環として、本業務では 10 月 5 日に再度現地に赴き、池の周辺や水中に拡散しているウシガエルの死体（幼生と幼体）を回収した。

２）サンプル採集

調査は日中に行い、池や河川において両生類と魚類を捕獲した。両生類については、これまでラナウイルス症による集団死事例が知られているウシガエルの幼生、幼体や成体を主な対象とした。また、それ以外に発見された別種の両生類についても捕獲した。魚類については、それぞれの調査地に生息する代表的な種を捕獲した。１回の調査あたりに採集する個体数は、両生類と魚類を合わせて 40 個体程度とした。繰り返し調査を行

う調査地①では、ウシガエルを 20 個体、フナ類の一種とヨシノボリの一種をそれぞれ 10 個体捕獲することを毎回の調査の目安とした。捕獲には、手網、かごワナ、手取り等を用いた。また、調査地①では環境省の別業務により外来種の駆除が行われている。ニホンアマガエルについては、この駆除業務から捕獲個体の提供を受け、本調査のサンプルとして用いた。

表２－１．現地調査を行った３地点の調査日、環境及び経緯.

地点番号	平成 22 年度の調査日	調査地の環境	両生類集団死に係る経緯
調査地①	6/22，7/28，8/23，9/13，9/28，10/5，10/28，11/29	池の直径が 200m程度のため池で、流出河川は希少魚類の生息場所に流れ込む。	平成21年９月にウシガエル幼生の集団死が発生した。
調査地②	9/15	ため池及びそこなら流出する用水路と河川。ため池では魚類を養殖している。	平成 21 年 10 月にウシガエル幼生の死体が多数確認された。
調査地③	9/14	ため池及びそこなら流出する用水路と河川。	平成 21 年 10 月にウシガエル幼生の死体が多数確認された。

捕獲した個体は、捕獲情報を示すラベルとともに管理し、ＤＮＡ検査を行う麻布大学獣医学部（宇根有美教授）の研究室に送付した。特定外来生物であるウシガエルについては、捕獲した現場で直ちに殺処置を行い、研究室まで氷冷した状態を保ったまま送付した。それ以外の捕獲個体（ウシガエル以外の両生類、魚類）については、サンプルの劣化を防ぐため生体で送付し、研究室において魚類・甲殻類麻酔剤 FA100(販売元：大日本製薬株式会社、製造元：田村製薬株式会社)を用いて麻酔した後、脊髄破壊法にて安楽殺処置をした。

また、現地調査による採集個体に加え、平成 21 年 10～12 月にウシガエルの集団死が発生した場所から採取し冷凍保管されていた両生類及び魚類のサンプルについても、今回の解析に加えた。

研究室に届けられた個体は、速やかに必要事項の観察と記録、各種解析のための採材等を行った。手順としては、まず外景検査（体型、出血、潰瘍、指端の壊死、その他の病変を観察）と写真等による記録を行ってから、体長と体重を測定した。その後、内景検査を実施し、必要に応じて内蔵、病変の様子を写真等で記録した。これらの作業を行った後、下記に示す分子生物学的、ウイルス学的及び病理検査用の材料を採取した。その上で、本業務では、分子生物学的検査（ＤＮＡ検査）によって、ラナウイルスへの感染状況を確かめた。

［分子生物学的検査］

両生類については、腎臓、脾臓、肝臓を冷凍保存し、通常はウイルスの検出率が高い

腎臓を優先的に検査に用いる。小型の魚類については内臓全てを、大型の魚類は腎臓を採材して検査に用いる。

［病理学的検査］

全身諸臓器をホルマリン固定し、発症あるいは死亡個体のみを検索する。

［ウイルス学的検査］

腎臓を冷凍保存し、ＤＮＡ検査で陽性になったものを培養する。

３）ＤＮＡ検査

ラナウイルスの検出を目的とするＤＮＡ検査の実施にあたっては、以下の方法に従った。

①ＤＮＡ抽出

検体からのＤＮＡ抽出にはKAPA Express Extractを用い、その取扱説明書に従って以下の手順で行った。

［手順１］ 1.5mLチューブにサンプルを入れ、10X KAPA Express Extract Buffer(5μL)、1U/μL KAPA Express Extract Enzyme (1μL)、D.W. (44μL) を添加。

［手順２］ 75℃で10分インキュベート。

［手順３］ 95℃で5分インキュベート。

［手順４］ ボルテックスで混和後、12000rpmで5分遠心。

［手順５］ 上清を新しいチューブに移し、ＰＣＲ用鋳型ＤＮＡとして使用。残りは－20℃で保存。

②ＰＣＲ法プロトコール

抽出したＤＮＡとラナウィルスのＭＣＰ遺伝子の一部を増幅する以下の３組のプライマーセットを用いてＰＣＲを行った。

プライマーセット１（増幅サイズは約230bp）

Rana M68F：(5’-GCACCACCTCTACTCTTATG-3’)

BIV MCP 154：(5’-CCATCGAGCCGTTCATGATG-3’)

プライマーセット２（増幅サイズは約530bp）

FV3MCP4F：(5’-GACTTGGCCACTTATGAC-3’)

FV3MCP5R：(5’-GTCTCTGGAGAAGAAGAA-3’)

プライマーセット３（増幅サイズは約 217bp）

RanaJP556F：(5’-GGTTCTTCCCCTCCCATTCTTCTT-3’)

RanaJP772R：(5’-GGTCATGTAGACGTTGGCCTCGAC-3’)

第１選択はプライマーセット１で、第２、第３選択にプライマーセット２、３と続けた。このうち２つ以上でバンドが出たものを陽性と判定した。

陽性と判定された検体については、以下の反応液とともに 200μL チューブに入れ、サーマルサイクラーを用いて、以下の反応条件でＤＮＡ増幅反応を行った。得られたＤＮＡ増幅産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロミド染色を行い、紫外線照射下で観察・撮影した。

＜ＰＣＲ反応液＞

試薬	使用量
2×Mighty Amp Buffer Ver.2	12.5μL
Mighty Polymerase (TaKaRa)	0.5μL
プライマーF, R mix(10μM)	0.5μL
抽出したＤＮＡ溶液	1μL
D.W.	10.5μL
Total	25μL

＜ＰＣＲ条件＞

熱変性：	98℃：2min.	…………	1cycle
熱変性：	98℃：10sec.		
アニーリング*：	52 又は 58℃：15sec.	…………	32cycle
伸長反応：	68℃：1min.		
伸長反応：	68℃：3min.	………	1cycle

*プライマーセット１又は３：58℃

プライマーセット２：52℃

（３）結果と考察

１）サンプル採集地点とサンプル数

ＤＮＡ解析に用いたサンプルの内訳を表２－２に示した。ウシガエルの割合が最も高く、解析を行ったサンプル全体に占めるウシガエルの割合は約５割を占めた（195/400 サンプル）。６月から 11 月まで実施した現地調査では、両生類ではウシガエル（幼生、幼体、成体）の他に、トノサマガエル及びヌマガエルが、魚類では、フナ類の一種（ギンブナと思われる）、ヨシノボリ類の一種（トウヨシノボリと思われる）、モツゴ及びタモ

表２－２．ＤＮＡ解析を行った種ごと及び採集地ごとの個体数（カッコ内は、そのうち採集時に死亡していた個体の数）．

採集地		種	平成21年			平成22年度						全体
			10月	11月	12月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	
調査地①	+	ウシガエル（成体）				1				1 (1)		2　(1)
（X池）	+	ウシガエル（幼体）	2				1	4		1		8
	+	ウシガエル（幼生）			1 (1)	17	20	34	40 (6)	19	20	151　(7)
		ニホンアマガエル（成体）								1 (1)		1　(1)
		トノサマガエル（成体）				2						2
		ヌマガエル（成体）				2						2
		フナ sp.		2	3 (3)	5	10	12	20	10 (1)	10 (1)	72　(5)
		ヨシノボリ sp.		2		10	10	10	20	10	10	72
調査地①		スジシマドジョウ	1									1
（Y川）	+	タイリクバラタナゴ	1									1
		タモロコ	1									1
		ドンコ	1									1
		ヌマムツ		5								5
		メダカ		1								1
調査地②	+	ウシガエル（幼体）							14			14
		モツゴ							13			13
		ヨシノボリ sp.							13			13
調査地③	+	ウシガエル（成体）							1			1
	+	ウシガエル（幼体）							9			9
	+	ウシガエル（幼生）							10			10
		タモロコ							10			10
		ヨシノボリ sp.							10			10
			6	10	4 (4)	37	41	60	160 (6)	42 (3)	40 (1)	400　(14)

+：外来種

ロコをそれぞれ捕獲し、ＤＮＡ解析に用いた。

今回最も重点的に解析を行った調査地①においては、現地調査ごとに 20 個体程度のウシガエル幼生及び上陸直後の幼体を捕獲することができたほか、同所的に生息するトノサマガエルとヌマガエル（いずれも成体）も捕獲して解析に加えることができた。なお、集団死が発生した９月後半～10 月に採集したウシガエル幼生には、採集時に既に死亡していた個体が含まれる。また、今年度、ウシガエル幼生の集団死が発生したのと同じ時期に、環境省の別業務によって調査地①から採集されたニホンアマガエル（死体で発見）についても今回のＤＮＡ解析に加えた。

これらに加え、平成 21 年度の別事業によって採集され冷凍保管されていた両生類及び魚類のサンプルについても解析を行った。これにはウシガエル、スジシマドジョウ、タイリクバラタナゴ、タモロコ、ドンコ、ヌマムツ、メダカが含まれていた。

２）ラナウイルスへの感染状況

ＤＮＡ解析の結果を表２－３に示す。平成 21 年度採取の両生類３個体（死亡個体１、生死不明２）及び魚類 17 個体（生存個体 14、死亡個体３）並びに平成 22 年度採取の両生類 197 個体（生存個体 189、死亡個体８）及び魚類 183 個体（生存個体 181、死亡個体２）の計 400 サンプルについて解析を行った結果、11 サンプルにおいてラナウイルスＤＮＡが確認された。年度別にみると、平成 21 年度に採集されたサンプルでは感染が確認されたものはなく、感染個体全てが本年度（平成 22 年度）のサンプルだった。また、感染個体のほとんどがウシガエル（10 個体［生存幼生５、死亡幼生４、生存幼体１］: 本種全体の約５%）であり、それ以外はニホンアマガエル（１個体［死亡成体１］）だけだった。一方、これら２種を除く種については、主に魚類を中心に合計 204 サンプルの解析を行ったものの、ラナウイルスに感染した個体は確認されなかった。

ラナウイルスＤＮＡが検出された個体は、ウシガエルでは６月下旬から９月下旬に採集されたもので、その中でも９月下旬の感染率が高かった。また、９月下旬から 10 月中旬にかけてウシガエルの集団死が確認されたものの、同期間にＤＮＡ解析用のサンプリングは行わなかったため、当該期間の感染率は不明である。10 月下旬のサンプルでは、ウシガエルにおける感染は確認されなかったものの、ニホンアマガエルでラナウイルスＤＮＡが確認された。

調査地間で比較すると、ラナウイルスへの感染が確認されたのは、調査地①（Ｘ池）で採集された個体だけであった（表２－４）。調査地①でウシガエルの集団死が発生したのと同じ９月に採集した調査地②及び調査地③のサンプルについては、ウシガエル、魚類ともにラナウイルスへの感染は認められなかった（ただし、調査地①でウシガエルの死亡が確認され始またのは９月下旬からだったのに対し、調査地②と③の現地調査は９月中旬に行われた)。なお、本年度は、調査地①（Ｙ川)、②及び③におけるウシガエルを含む両生類及び魚類の集団死の発生は報告されていない。

表２－３．ＤＮＡ解析で確認されたラナウイルスへの感染個体数（種別）（カッコ内は検査を行った個体数）．

		平成21年度				平成22年度							合計
		10月	11月	12月	全体	6月	7月	8月	9月	10月	11月	全体	
ウシガエル	+	0 (2)	0 (0)	0 (1)	0 (3)	1 (18)	0 (21)	1 (38)	8 (74)	0 (21)	0 (20)	10 (192)	10 (195)
ニホンアマガエル		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)	1 (1)
トノサマガエル		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (2)
ヌマガエル		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (2)
スジシマドジョウ		0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)
タイリクバラタナゴ	+	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)
タモロコ		0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (10)	0 (11)
ドンコ		0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)
ヌマムツ		0 (0)	0 (5)	0 (0)	0 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (5)
フナ sp.		0 (0)	0 (2)	0 (3)	0 (5)	0 (5)	0 (10)	0 (12)	0 (20)	0 (10)	0 (10)	0 (67)	0 (72)
メダカ		0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)
モツゴ		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (13)	0 (13)
ヨシノボリ sp.		0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (2)	0 (10)	0 (10)	0 (10)	0 (43)	0 (10)	0 (10)	0 (93)	0 (95)
計		0 (6)	0 (10)	0 (4)	0 (20)	1 (37)	0 (41)	1 (60)	8 (160)	1 (42)	0 (40)	11 (380)	11 (400)

+：外来種

表２－４．ＤＮＡ解析で確認されたラナウイルスへの感染個体数（調査地別）（カッコ内は検査を行った個体数）．

	平成21年度				平成22年度							合計
	10月	11月	12月	全体	6月	7月	8月	9月	10月	11月	全体	
調査地①（Ｘ池）												
ウシガエル	0 (2)	0 (0)	0 (1)	0 (3)	1 (18)	0 (21)	1 (38)	8 (40)	0 (21)	0 (20)	10 (158)	10 (161)
他種のカエル類	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (5)	1 (5)
魚類	0 (0)	0 (4)	0 (3)	0 (7)	0 (15)	0 (20)	0 (22)	0 (40)	0 (20)	0 (20)	0 (137)	0 (144)
全体	0 (2)	0 (4)	0 (4)	0 (10)	1 (37)	0 (41)	1 (60)	8 (80)	1 (42)	0 (40)	11 (300)	11 (310)
調査地①（Ｙ川）												
魚類	0 (4)	0 (6)	0 (0)	0 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (10)
全体	0 (4)	0 (6)	0 (0)	0 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (10)
調査地②												
ウシガエル	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (14)	0 (14)
魚類	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (26)	0 (0)	0 (0)	0 (26)	0 (26)
全体	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (40)	0 (40)
調査地③												
ウシガエル	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (20)	0 (20)
魚類	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (20)	0 (20)
全体	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (40)	0 (0)	0 (0)	0 (40)	0 (40)

調査地①におけるウシガエルの感染個体の内訳をみると（表２－５）、この場所で平成22年度始めに感染個体が認められたのは６月（１個体）で、その後８月（１個体）にも検出された。集団死の発生を確認した９月28日の調査では、検査したうちの40％の個体（８感染個体／20検体）からラナウイルスが検出された。

感染個体は全て幼生又は上陸直後と思われる幼体だった。しかし、10月25日に別業務によって採集され検査で陽性だったニホンアマガエルは、メスの亜成体ないし成体だった（表２－６）。

集団死発生中の９月28日に採集されたウシガエルの個体に関する情報を表２－７～２－８に示す。このときに採集された個体には、目の充血や皮膚の浮腫などの外部形態の異常、又は捕獲の際に逃避行動等に通常とは異なる状態が認められる個体が含まれていた。このうち、外部形態に異常が認められた個体のうち約４割（５個体/12個体）の個体がＤＮＡ検査によって陽性と判定された。その一方で、外部形態等に何らかの異常が認められたものの、ラナウイルスが検出されなかった例もあった（７個体/12個体)。集団死発生中の平成22年９月28日に採集された個体では、採集時に死亡していた個体は比較的高い割合でラナウイルスへの感染が認められた（４個体/６個体)。しかし、外部形態や行動に異常が認められたり、発見時にすでに死亡している個体であっても、ラナウイルスが検出されなかった例もあった（４個体/10個体)。

採集時に死亡していた個体については、14個体（ウシガエル８個体、ニホンアマガエル１個体、フナ sp. ５個体：いずれも調査地①（Ｘ池）から採集）についてＤＮＡ検査を行ったが、このうちラナウイルスへの感染が確認されたのは５個体（ウシガエル４個体、ニホンアマガエル１個体）だった。前述のように平成22年９月28日に採集されたウシガエル死体の感染率が高かったが、それ以外の死亡個体については、ニホンアマガエル１個体（平成22年12月25日）を除き、ラナウイルスへの感染は認められなかった。

これまでの調査結果では、ラナウイルスが平成21年度に確認された場所と同じ特定の地点において、平成22年度も引き続き同ウイルスが分布していたことが明らかにされた。また、集団死が確認された９月下旬～10月中旬のうち、その当初にあたる９月下旬にはラナウイルスの感染が高頻度で確認された。他方、集団死のピーク期にあたる10月上旬～中旬には、ラナウイルスの調査を実施しなかったことから当該期間の感染率は不明であり、ラナウイルスの感染と集団死の因果関係について、十分な解明までには至っていない。今後、調査頻度や解析に用いるサンプル数を増やすこと等に加え、病理検査等を実施することで、両生類へのラナウイルス症の影響をより詳細に理解することができると期待される。

表２－５．調査地①（Ｘ池）においてラナウイルス感染が認められたウシガエルの個体数（カッコ内は検査を行った個体数）.

	平成21年						平成22年								合計
	10/23	11/4	12/7	12/16	12/22	全体	6/22	7/28	8/23	9/13	9/28	10/28	11/29	全体	
成体	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (2)	0 (2)
幼体	0 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)	0 (1)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)	1 (6)	1 (8)
幼生	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (1)	1 (17)	0 (20)	0 (34)	0 (20)	8 (20)	0 (19)	0 (20)	9 (150)	9 (151)
全体	0 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (3)	1 (18)	0 (21)	1 (38)	0 (20)	8 (20)	0 (21)	0 (20)	10 (158)	10 (161)

表２－６．調査地①（Ｘ池）においてラナウイルス感染が認められたウシガエルの個体の状態.

種名	性	採集日	全長（mm）	体重(g)	発見時の状態※	備考
ウシガエル	不明（幼生）	平成22年6月22日	104	13.6	生存／普通	口唇白い。
	不明（幼体）	平成22年8月23日	55	6.7	生存／普通	
	不明（幼生）	平成22年9月28日	95	12.9	生存／普通	左眼充血。両後肢大腿に浮腫。
	不明（幼生）	平成22年9月28日	-	8.8	生存／普通	
	不明（幼生）	平成22年9月28日	90	10.6	生存／異常	
	不明（幼生）	平成22年9月28日	76	8.4	生存／異常	右眼赤い。
	不明（幼生）	平成22年9月28日	93	9.0	死亡／異常	左眼赤い。
	不明（幼生）	平成22年9月28日	99	8.8	死亡／異常	右眼赤い。
	不明（幼生）	平成22年9月28日	104	12.4	死亡／異常	左眼赤い。
	不明（幼生）	平成22年9月28日	95	10.7	死亡	
ニホンアマガエル	メス	平成22年10月25日	-	2.2	死亡	

表２－７．９月 28 日に調査地①（Ｘ池）から採集されたウシガエルの状態.

項目	状態	ＤＮＡ解析の結果		
		陽性	陰性	計
発見時の外部形態	普通	3	5	8
	目の充血	4	6	10
	目の充血／皮膚の浮腫	1	0	1
	脱臼	0	1	1
発見時の状態	普通	2	8	10
	異常（逃避行動等）	2	2	4
	死亡	4	2	6

表２－８．９月 28 日に調査地①（Ｘ池）から採集されたウシガエルの体サイズ.

	全長（mm）			体重（g）		
	全体	陽性	陰性	全体	陽性	陰性
N	19	7	12	20	8	12
mean	9.5	9.3	9.6	11.3	10.2	12.0
SD	1.3	0.9	1.5	2.9	1.7	3.4
最大	12.5	10.4	12.5	20.93	12.85	20.93
最小	6.1	7.6	6.1	7.66	8.43	7.66

表２－９．調査地①（Ｘ池）において採集時に死亡していた個体のＤＮＡ解析の結果.

種	採集日	全長（mm）	体重（g）	ＤＮＡ解析の結果
ウシガエル（幼生）	平成 21 年 12 月 22 日	－	－	陰性
	平成 22 年 9 月 28 日	9.3	8.97	陽性
	平成 22 年 9 月 28 日	9	11.02	陰性
	平成 22 年 9 月 28 日	9.9	8.84	陽性
	平成 22 年 9 月 28 日	9	11.92	陰性
	平成 22 年 9 月 28 日	10.4	12.4	陽性
	平成 22 年 9 月 28 日	9.5	10.66	陽性
ウシガエル（成体）	平成 22 年 10 月 28 日	－	358	陰性
ニホンアマガエル（成体）	平成 22 年 10 月 25 日	－	2.15	陽性
フナ sp.	平成 21 年 12 月 7 日	－	－	陰性
	平成 21 年 12 月 16 日	－	－	陰性
	平成 21 年 12 月 16 日	－	－	陰性
	平成 22 年 10 月 28 日	6.5	3.4	陰性
	平成 22 年 11 月 29 日	5.6	1.72	陰性

第３章　両生類の感染症に関する知見の取りまとめ

１．両生類の感染症に関するヒアリング調査

（１）ヒアリング対象者と項目

ここでは、ラナウイルス症を中心とする両生類の新興感染症等に関する最新の情報を得るために、病理学、感染症学、両生類学、獣医学等の観点から専門家にヒアリング調査を実施した。

ヒアリング調査の対象と実施日は以下の通りである。

宇根有美（麻布大学獣医学部獣医学科教授）
日時：6 月 10 日 15:00-19:00
場所：麻布大学獣医学部キャンパス

大迫典久（独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所魚病診断・研修センター所長）
栗田潤（独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所魚病診断・研修センター主任研究員）
日時：11 月 30 日 14：00～16：00
場所：水産総合研究所養殖研究所南勢庁舎

松井正文（京都大学大学院人間・環境学研究科相関環境学専攻教授／日本爬虫両棲類学会会長）
日時：12 月 28 日 16:30～17:55
場所：財団法人自然環境研究センター会議室

村田浩一（日本大学生物資源科学部教授／野生動物医学会会長）
日時：12 月 21 日 15:00～17:00
場所：日本大学生物資源科学部動物資源科学科野生動物学研究室

（敬称略）

本調査で設定したヒアリングの項目は以下の通りである。ただし、対象者の専門に応じて質問の内容は調整した。

① ラナウイルス症等の両生類感染症の実態

・生物学的特性

・感染症としての特性

・野外での発生事例

・検査方法、消毒方法、その他必要な対策

・他分類群におけるラナウイルス症等の感染状況

② 両生類保全のための感染症対策

・過去の両生類感染症の対策事業（主に、カエルツボカビ症対策）の評価

・在来の両生類に対する新興感染症のリスク

・情報収集及び対策のために構築しておくべき体制

・参考とすべき既存の体制及び対策

・研究機関、学会、自然保護団体等との連携の可能性

１）ラナウイルス症等の両生類感染症の実態

①ラナウイルスについて

・ラナウイルス（以下ＲＶとする）は、イリドウイルス科ラナウイルス属のウイルスを指す。

・宿主範囲は広く、両生類や魚類など様々な変温動物に感染する。そのため、カエルツボカビ症に比べると対策をとるのが難しい。

・エンベロープ（外膜）を持つ。一般に、この形態的特徴を持つウイルスはアルコール等で比較的容易に不活化できる。

・両生類に対しては高い病原性を示す場合がある。病気への耐性は両生類の種によって異なる。

・北米とヨーロッパではＲＶ症によるカエルの集団死の発生事例がある。ヨーロッパで集団死を引き起こしたＲＶは、北米から移入した可能性が指摘されている。

・ウシガエルとカスミサンショウウオでＲＶ症を原因とする集団死が確認されている。

・国内で確認されているのは海外のものと別のタイプのウイルスである可能性がある。

・魚類では、20 年以上前にウナギの集団死の原因病原体がＲＶだった可能性がある。

・日本国内ではＲＶは越冬明けもしくは９月頃に活性が高くなると考えられる。９月は当年生まれのウシガエル幼生の一部が上陸する時期と重なる。

・ＲＶへの感染はＤＮＡ検査によって調べることができる。ただし、宿主が死亡するとウイルスも増殖できなくなるので、死亡後長時間経った死体からはウイルスが検出されにくくなる。

②集団死・不審死について

・魚類の場合、集団死は急激な環境（水温や水質）の変化でも発生する。

・種や個体特性（齢、体サイズ）が偏って発生する集団死においては感染症が原因として疑われる。一方、不特定多数の個体が死んでいる場合は、感染症が原因である可能性は比較的低い。

・ウイルスに感染して発症して死んだ個体はウイルスのかたまりといえる。そのため、集団死があった場合は、とにかく死体を取り除き、大量のウイルスが放出されないようにしなければならない。

２）両生類保全のための感染症対策

・両生類が関係する感染症はたくさんある。現在、国内ではカエルツボカビやラナウイルスだけが注目されているが、新興感染症に対応して在来種を保全していくためには、そうした感染症全てを対象にして、警戒態勢を整えておく必要がある。

・クライシスマネージメントとリスクマネージメントの２つに対して準備しておく必要がある。クライシスマネージメントとは、実際に病気の流行が起こった際に迅速に対応し、小規模の被害で封じ込めることを目的とした準備体制。リスクマネージメントとは、リスクプロファイリングなどによる被害予測や危険性の把握、危険度の優先づけを行い、流行前の準備。

・系統解析により国内のカエルツボカビの起源は調べられたが、両生類への影響についてはわかっていない。

・集団死発生の情報収集については、学会や自然愛好家同士のネットワークに協力を得ることができるかもしれない。

・緊急避難としての域外保全は技術的には可能であるが、累代飼育された個体の野生復帰は難しいだろう。

（３）個別のヒアリング調査の結果

１）宇根有美氏（麻布大学獣医学部獣医学科）

①ラナウイルス症について

＜生物学特性、海外の事例＞

・ラナウイルス（以下ＲＶとする）の感染症がカエルツボカビより危険性が高いと考えられる理由として、その宿主域が広いことが挙げられる。対策を行うに当たっても、対象とすべき種群が多岐にわたることが予想され、対策が非常に取りづらい。

・アメリカ大陸で流行したＲＶについてＤＮＡ検査を行った結果、見つかったのは３つの代表的な種（FV3、トラフサンショウウオウイルス、ボーレウイルス）だけである。

・ヨーロッパにおいて、ヨーロッパアカガエルの集団死を引き起こしたＲＶは遺伝子検査によってFV3であることが判明している。そのため集団死はアメリカからヨーロッパへＲＶが伝搬して引き起こされたと考えられている。
・ＲＶの発生している場所において、同所的に生息していたカメにも死亡個体が確認されている。死亡原因は不明であるがＲＶに罹患していた。ＲＶに感染したカエルの幼生を食べることで感染した可能性が高い。
・カエルツボカビは両生類でのみ感染し、増殖する感染症であったが、ＲＶは魚類にも感染し、増殖することが確認されている。
・ＲＶは高い病原性があることは確認されているものの、罹患した種ごとの耐性によって発症状況は変化する。このように様々な種が罹患し、種毎に発症状況が異なることが調査を難しい状況にしている。
・ＲＶは感染から発症までの間に時間がかかるため、例えばサンショウウオなどの種では、産卵地などで感染したとしても、単独行動に戻った後に発症することが考えられ、実態を把握するのが難しい。
・アメリカでは、１年で２、３件の流行が発生している。
・アメリカでは、ウシガエルにおいて、越冬明けの幼生でウイルスの活性が高いことが報告されている。

＜国内の事例＞
・日本国内での集団死は、2008年に１ヶ所、2009年に４ヶ所において発生したことが確認されている。
・日本では今のところ野外のウシガエルと、飼育下のカスミサンショウウオ（野外から採集したもの）で集団死が確認されている。確認されたＲＶの遺伝子検査の結果、それぞれの宿主毎に2種のＲＶが確認されている。そして、それぞれがアメリカで確認されている基準種とは異なるタイプであることが判明している。
・日本国内でこれまでに確認されたＲＶは、海外で確認されているＲＶと別種である可能性が高い。そのため、海外事例のデータをそのまま応用することはできない。
・ＲＶは様々な種に感染することが分かっている。これまで国内の両生類では普通種でのみ集団死が報告されているものの、今後希少種にも集団死が出てくる可能性がある。
・日本と台湾で両生類の集団死を引き起こしたとされるＲＶは、それぞれRC-JP、RC-TWとして名前が付けられて登録されている。日本のカスミサンショウウオで確認されたものはHNVである。
・カスミサンショウウオの集団死は、河川開発の際に救い出しを行って避難させていた施設内で発生した。感染と発症は幼生から成体まで全てで確認された。アメリカにおけるサンショウウオでの発症は、幼生での確認がほとんどであった。

・RC-JP 株を使い、ウシガエル幼生への感染実験を実施しているが、今のところ発症は確認していない。
・日本国内でも越冬明けもしくは９月に活性が高くなると考えられる。宿主の免疫が落ちる時にＲＶは活発となると考えられる。９月は、当年生まれのウシガエル幼生の一部が上陸する時期と重なる。
・国内におけるＲＶの実態を把握するためには、活性の高いと考えられる特異時期に広範囲で調査を実施するべき。国内のＲＶの由来を判断する材料にもなる。
・なお、2007 年は 35 例の野外における両生類の集団死が観察されている。カエルツボカビの全国調査がなされるなど最も観察者の目が多かった年にあたる。集団死の原因は様々であったが、ＲＶによるものはなかった。

＜検査方法＞
・採取個体でＰＣＲ検査を実施する場合、陽性個体は全体の 10～20%ほどしかいない場合も想定される。そのため、確実な検査のためには、１エリア、１種 20 個体のサンプルが必要。
・ＰＣＲ検査でＲＶが検出されても死亡原因とは断定できない。ただし、内臓よりＲＶが培養（培養ができるくらいのＲＶが増殖していたこととなるため）できたならば感染死と考えてよい。

＜集団死が確認された場合の処理方法＞
・ＲＶはエンベロープ（外膜）を持っているため、アルコールによって不活性化することが可能。調査等に使用した器材は、未消毒のままにはせず、ビニール袋に入れて消毒用エタノールに浸して処理するのが良い。
・ウイルスは熱に弱いため、夏季などは道具類をビニールなどに密閉して日光に当てるほか、車のトランクに入れておくなどすれば内部が高温となってウイルスを死滅させることが可能である。
・土壌や水中など、自然中にいるものの消毒自体は無意味である。
・ウイルスは生物の細胞内でのみ増殖することができる。そのため、自然に放出されたウイルスに関しては、細胞内に取り込まれない限り、そのまま死んでいくだけである。
・ウイルスに感染して発症して死んだ個体はウイルスのかたまりといえる。そのため、集団死があった場合は、とにかく死体を取り除き、大量のウイルスが放出されないようにしなければならない。
・取り除いた死体の処理方法としては、焼却処分が最も確実。埋土処理する場合は、十分量の生石灰で感染個体を覆う必要がある。

②今後取り組んでおくべきこと

・海外にはザリガニペストやコイ春ウイルス、レッドマウスといった危険な病気が知られている。そのためこれらの病原体が国内へ侵入した場合の危険性を示すためのリスクプロファイリングを作成している。

・個人的にはサンショウウオの他の感染症(寄生虫症)についても調べている。

③今後構築すべき体制

・考えるべきこととして、クライシスマネージメントとリスクマネージメントの２つに対して準備しておく必要がある。クライシスマネージメントとは、実際に病気の流行が起こった際に迅速に対応し、小規模の被害で封じ込めることを目的とした準備体制。リスクマネージメントとは、リスクプロファイリングなどによる被害予測や危険性の把握、危険度の優先づけを行い、流行前の準備。

・何か流行が起こった時に検定や調査を実行するための独自の検査機関が環境省にも必要。

・病理学的検査は、感染と発症の関係を見る上で絶対に必要と考える。

２）大迫典久氏、栗田潤氏（独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所魚病診断・研修センター）

①ラナウイルスを含むイリドウイルス類による感染症について

＜最新の知見に基づくイリドウイルスの特性＞

▽ 生物学的特性

・イリドウイルス科は大型の２本鎖ＤＮＡをもち、ゲノムサイズは末端の重複配列を含めると 140-303kbp。

・最初は昆虫から発見されたが、脊椎動物を含む様々な動物から報告されている。

・イリドウイルス科ウイルスの宿主は、現在のところ、変温動物に限られ、恒温動物では知られていない。

・脊椎動物に感染するものとしては、リンホシスティウイルス属、ラナウイルス属、メガロサイティウイルス属が知られている。

・リンホシスティウイルス属並びにマダイイリドウイルスの属するメガロサイティウイルス属の宿主は、現在のところ魚類に限られている。

・ラナウイルス属の宿主特異性は低く、魚類、両生類、爬虫類に感染することが知られている。

・一般にイリドウイルス科はエンベロープを持たない。このタイプのウイルスは、消毒薬への耐性が比較的高い（注：ただし、ラナウイルスはエンベロープを持つ）。

▽ 病原性

・リンホシスティウイルス属は、病原性が比較的低く、致死率も低い。症状としては、体表にカリフラワー状の疣ができる。このウイルスの分離培養は難しい。

・ラナウイルス属とメガロサイティウイルス属の病原性は高い。魚類では、感染個体は高い確率で死亡する。ただし、症状は感染する種や個体特性（齢、サイズ等）によって異なる。

▽ 感染事例

・国内でのラナウイルス感染症の最初の事例としては、20 年以上前にイリドウイルス科に属する ICDV（Icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus）がウナギ病魚から分離されたことがこれに該当するかもしれない。ただし、その後研究は進められなかったため、本ウイルスがラナウイルス属であるかどうかは確認されていない。

・マダイイリドウイルスは、スズキ目を中心とする養殖魚に被害がある。イシダイとイシガキダイで最も感受性が高く、マダイでは被害事例が多い。

・マダイイリドウイルスは本来外国産であり、東南アジアや東アジアから輸入した養殖魚の種苗（香港からのカンパチの種苗など）に由来して日本国内へ侵入したと思われる。

・マダイイリドウイルス症が発見された当初は、集団死の発生件数が著しく増加したが、現在、発生件数は比較的安定傾向にある。ワクチン注射や飼育業者の感染予防策が効果を示しているようだ。

・マダイイリドウイルス症の場合、一旦、へい死が起こった場所では、その後も繰り返しへい死が発生する。これには、場所の環境特性（水温条件など）が関係しているのかも知れない。ウイルス増殖に適した水温は 25℃前後である。日本では夏の病気として知られる。これまでの発生の太平洋側の北限は神奈川県、日本海側は石川県である。

・へい死は急激な環境（水温や水質）の変化でも発生する。

・感染症が原因となる場合は、種や個体特性（齢、体サイズ）が偏る場合が多い。不特定多数の個体が死んでいる場合は、感染症が原因である可能性は比較的低い。

・感染地域でのウイルスの動態は分かっていない。養殖場と野生動物との関わりは全く分からない。いけすなどを使った養殖場では、養殖個体と野生個体との接触を防ぐことは難しい。

＜ラナウイルスに関する一般的知見＞

・ラナウイルス属の EHNV(流行性造血器壊死症ウイルス)は、レッドフィンパーチに致死的な被害を出すが、ニジマスに対する病原性はやや劣る。実験感染では他の魚類への病原性も確認されている。北米では、EHNV ではないラナウイルス属のウイルスによるオオクチバスなど野生魚のへい死事例がある（Plumb et al., 1996. Journal

of Aquatic Animal Health 8:265-270.)。また北米では、魚類のへい死発生水域で、カエル類も死んでおり、別々に分離された双方の原因ウイルス及び過去にこの地域のカエル類から分離されたウイルスが互いに同一であったという報告（Mao et al., 1999. Virus Research 63: 45-52.）もある。

・ヨーロッパではナマズへの ECV（European catfish iridovirus）の感染例もある。

・現在は魚類のラナウイルスでは EHNV のみがＯＩＥに登録されている（以前は ECV も含まれていたことがある)。

・養殖研で、以前ウシガエルから採取したラナウイルスをホンモロコに感染させる実験を行ったところ、対照区と死亡率に差がなく、ホンモロコへの病原性は低いことが示された。

・ハタ類に感染する GIV＝SGIV（他のハタのメガロサイティウイルス GIV＝TGIV と区別するため、現在は S をつける事が多い。S は Singapore の意味）はラナウイルス属の中でも特殊なものであるが、他のラナウイルスは遺伝的にかなりまとまったグループである。

・観賞魚（淡水魚のエンゼルフィッシュやグッピー）でもラナウイルス属のウイルスへの感染例がある（Schuh and Shirley, 1990. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 21:95-98, Hedrick and McDowell, 1995. Veterinary Research 26:423-427. カナダやアメリカの事例。輸入した観賞魚で発生した。エンゼルフィッシュの輸入先は不明、グッピーは東南アジアから輸入。）

＜検出方法＞

・ラナウイルスの一種 EHNV は分離培養が容易である。また、ＰＣＲ検査にかけることによっても検出できる。ポリクローナル抗体を用いた検出法もあるが、これだけでは EHNV かどうか確定できないことから、現在は用いられることは少なくなった。

・宿主が死亡するとウイルスも増殖できないため、死亡後日数が経って腐敗が進行したような個体では検出できるウイルスの量が減少する。

・一般に、ウイルスは一旦魚体から出るとあまり長生きできない。すぐに環境中のバクテリアのプロテアーゼなどによって分解されていく。一方、バクテリアのいない滅菌水などでは、比較的長く生きられる。

＜消毒方法＞

・次亜塩素酸ナトリウムやさらし粉（次亜塩素酸カルシウム）などの塩素剤やヨード剤であれば確実に消毒できる。アルコールでも良い。

・感染個体からウイルスを完全に除去するのは難しい。治癒していたり、症状が落ち着いていたりしていても、一度感染した個体はキャリアになる可能性があり、健康個体と同じに扱うことはできない。

＜その他の注意すべき感染症＞

・イリドウイルス属の TIV と CIV は昆虫に感染する。害虫駆除のための生物農薬として応用面で注目され研究が進められていたようだ。

②魚類でへい死が発生した際の対応

＜発生時の対応＞

・養殖魚がへい死した場合、感染症が特定疾病か否かで大きく対応が異なる。

＜コイヘルペス症の事例＞

・コイヘルペス症を引き起こすウイルスは、ヘルペスウイルス科に属する。現在ヘルペスウイルス科は３亜科に分割されており、コイヘルペスウイルスは他の魚類のヘルペスウイルスと共にそのうちの１亜科に属する。

・野外でのへい死発生時の対策をとる目的は二次感染を防ぐことである。発生地では死体を回収することになっている。また、発生地から外部へは個体の移動、放流は禁止されている。

・コイヘルペス症は定期的に同じ場所で発生する。完全になくなることはないようだ。

・コイヘルペスはコイに特異的な感染症なので、対応も比較的簡単である。SVC（コイ春ウイルス血症）など、様々な魚種に感染する病気の方が対策は難しい。

・回収したへい死個体の処理としては、焼却、埋置がある。埋置の場合は、汚染水の流出等に注意する必要がある。

・普通、ウイルスは内臓で多く増殖するが、体内での分布密度の濃淡は不明。感染検査には、腎臓、脾臓、えらを用いることが多い。ＰＣＲ検査であれば、表皮など、ウイルスが比較的少ない部位からでも検出できる。

＜野生の魚類の疾病対策＞

・希少魚種を含め、感染症対策のための研究は進んでいない。

・水産分野での疾病対策については、基本的に集約的に飼育している養殖魚種が対象。天然のものについて、対策が難しいと認識している。

・ 養殖場であれば、病気の発見・把握がしやすいが、野外個体を加えた実態把握は非常に難しい。

・オオクチバスの防除手法として、ラージマウスバスラナウイルス（LMBV）の導入が議論されたことがある。現実的には、ラナウイルスは宿主範囲が広いので、在来種に感染する可能性があること、また仮にその時点では在来種に感染しないとしても、ウイルスが変異して在来種に病原性を示すようになる場合も考えられるので、ウイルスの導入については賛成できない。

<予防体制、対処の体制>

・養殖業者は病気の感染対策、予防、検査を行っている。
・養殖場でへい死が発生した場合、業者から当該地域を管轄する水産試験場に連絡がある。
・水産試験場では一通りの検査ができる。よくある魚病であれば、水産試験場が対応する。
・水産試験場の担当者は、普段から養殖業者とつきあいがあるので、業者も気軽に検査を依頼してくる。健康診断を目的とする検査依頼もある。
・養殖業者と取引のある薬品業者が、検査を行うこともあるようだ。
・へい死が病原体によるものであるかは、現場の水産試験場で判断されている。
・全国の水産試験場担当者を対象に、養殖研で実習を行っている。特定の感染症については、養殖研で作成した魚病診断マニュアルに沿って検査を実施する。
・感染症が特定疾病であれば、現地での検査の後、養殖研で確定診断を行う。そこでも陽性が確認されれば（確定診断)、法的根拠に基づいて、都道府県知事が処分命令を出すことができる。過去にはコイヘルペス症で適用事例がある。一般的な病気については、処分を強要できない。
・通常、感染症の検査は試験場が対応する。検査方法には抗血清法とＰＣＲ法などが用いられる。へい死が拡大し、かつ試験場で原因解明できない場合には、養殖研に協力要請がくる（担当者間のやり取り)。養殖研のウェブサイトにある不明病診断の項目（水温、管理状況、簡易検査の結果等）に沿って調書を作成した上で、養殖研が検査を行う。現地対応は水産試験場と養殖業者が行うことから、養殖研が現地に赴くことは少ない。
・新興感染症のうち、感染力が著しいものは、原因が特定されれば新疾病として指定される。感染個体は処分されることもある。
・対処法として水産医薬法で許可された薬は使えず、新薬開発には時間がかかるので、新興感染症に対して薬で対応するのは難しい。限られた場合ではあるが緊急的に獣医が薬剤を処方することもある。
・過去にクルマエビでへい死が発生した際、産業全体がダメージを受けた。これを期に、へい死発生時には初期対応と蔓延防止を主眼に対応している。
・水産資源保護法の中で種苗の輸入に際しては、衛生証明書が求められたり、輸入後一定期間隔離飼育されたりして、病気の発生・蔓延防止措置がとられている。業者自身が感染個体を販売しないよう注意している。
・野外河川で魚の大量のへい死が発生すると、水産試験場が対応することになるであろう。しかし、水産資源でなければ、必ずしも関与するとは限らない。

３）松井正文氏（京都大学大学院人間・環境学研究科相関環境学専攻教授／日本爬虫両棲類学会会長）

①外来生物問題としての両生類新興感染症

＜2007 年のカエルツボカビ対応への評価＞

・五箇氏らの論文（Goka et al., 2009. Molecular Ecology 18:4757-4774）の焦点はツボカビの起源にあり、両生類の保全に関係するものではない。

・カエルツボカビ以外の感染症が存在することも考えられる。日本ではもうカエルツボカビが問題ないのかどうかをはっきりさせる必要がある。それまでは、引き続きペットとして外国産のカエルを飼育している人は処理水の扱いに気をつけるべきである。個人的には日本産のカエルがカエルツボカビに対して安全であるとは思っていない。依然として問題があると思っており、安全宣言は出せない。

・これまでの環境省が行ってきたカエルツボカビ対策の結果として、平成 19～21 年度のカエルツボカビ等実態把握調査検討業務の報告書が公開されていることは知らなかった。報告書の存在が知られていないことが問題である。

・この問題では日本中を騒がせたのだから、もっと一般に対しても説明する必要がある。環境省はよく対応したと思っている。だからこそ、もっと現在の状況（安全宣言は出せないこと）について、マスコミ等を使ってアピールした方がよい。単に HP 上で報告書を開示するだけでなく、現状についてアピールして公表した方がいい。

・今後は感染症に対応できる人材を育成することも大切である。現状のように一部の研究者だけしか関与していない状態は問題である。

＜現在の新興感染症の対応について＞

▽カエルツボカビ

・国内由来である可能性が高い。野外での深刻な影響は分かっていない。

▽ラナウイルス

・現時点でへい死発生は局所的、分布は不明確。発症するのはほとんどウシガエルである。在来種の生息に与える影響の解明は必要である。

・ラナウイルスは農林水産業にも関係がある。魚類等にも重大な影響があるならば、そちらで対応を行えばいいのではないか。

・ラナウイルスについては、島田知彦氏（京都学園大学［4 月から愛知教育大に着任］）が問題に取り組めるのではないか。

・ラナウイルスについては基礎研究を進めていく必要がある。複数の研究者に調査してもらいたい。また、得られた結果等について、もう少し情報を開示するようにしてもらいたい。

▽その他

・原因は不明だが四国で集団死の発生例があることを聞いている。

・三重県と滋賀県の県境の池でヤマアカガエルが集団死した事例があった。これがラナウイルスであった可能性も否定できない。今年は発生していないが、これまで２年続けて発生している。県レベルに聞くことも大事だが、カエル探偵団でも協力できるかもしれない。また、日本爬虫両棲類学会でも協力できる可能性はある。

②在来両生類の保全からみた感染症への対応

・現状として、越前市のアベサンショウウオ、広島のナゴヤダルマガエル、やんばるの固有両生類については、それぞれ熱心な地域の専門家がいて動向に注目しており、監視の目がある状況といえる。アベサンショウウオの例では地元でモニタリングを行っているので大丈夫だと思う。またナゴヤダルマガエルの例も大丈夫だと思う。やんばるでは監視がやや手薄であるが、それでも情報は入ってきやすいと思う。問題はそれ以外の人目に付きにくい場所で発生した場合の対応である。例えばヤマアカガエルの場合は、感染症が発生しやすいと考えられる早春の繁殖期にはほとんど調査が行われないであろう。なお、水田で集団死が発生した場合には、農業関係者から情報が入ってくると思う。

・域外保全については、最近は安易に実施される風潮があるが、私は基本的にそれに反対である（ナゴヤダルマガエルは安佐動物公園、ホクリクサンショウウオはいしかわ動物園で累代的に飼育されている。広島大学ではイボイモリが飼育されている）。どの種でも域外での飼育はそれほど支障なくできると思うが、累代飼育された個体を野生に復帰させることができるかどうかが本質的な問題である。累代飼育個体は肥満体になっていることが多く、野外では生息できないであろう。

・両生類の多くの種では、緊急避難としての域外保全は可能であろう。沖縄ではどのような受け入れ体制があるかは知らないが、緊急避難は実施できると思う。ただし、オオサンショウウオだけは大がかりな設備が必要となり、緊急避難といえどもきわめて大変である。

・もし、やんばる等で深刻な感染症が発生した場合は、国などの大きなレベルで研究できるところに委託する体制がよい。ワクチンの開発も必要であろう。

・絶滅危惧種で感染症が発生した条件などを想定して、感染症の原因を究明する体制を作っておいた方がよい。

・環境省だけでなく、農水省等も含めた体制をつくることが望ましい。

③連絡・分析体制

・カエル探偵団に情報提供を求めるのであれば、会員数が県ごとに異なっているため、まずは、それらを把握する必要がある。会員がいない県では情報収集について別の

方法を考えないといけない。オオサンショウウオの会も重要な団体である。ゲンゴロウなど水生昆虫の愛好家のネットワークについても活用していくべきで、これらの団体等に対しては、カエルの感染症に関する情報も発信していくべきである。

・ボランティアベースの情報収集だけでは難しいかもしれない。(前回のカエルツボカビの情報収集では、マスコミの盛り上がりと謝金の存在があった。)

・ラナウイルスの発生確認に関しては、死亡個体の特徴を利用すべきである。発症して死亡した個体は水に白い腹を出して浮いている。例えばこのような死体が 1 カ所で 10 個体以上観察された場合には報告するなどといったものにすればよい。そして、それらの情報を集める窓口を作っておくべきである。水田では農業関係者からの情報提供が期待できる。一方、山奥の沢沿いでは監視の目が少なく、そこに生息する両生類に関する情報がもたらされにくい。

・日本爬虫両棲類学会は保全を主目的として発足した学会ではない。また学会規模も小さく保全専門の部会があるわけでない。現状としては和文誌に 1 頁程度を保全対応として設けていくことができるのではないか。また、九州両生爬虫類研究会は情報収集の強い味方になる。沖縄も沖縄生物学会や沖縄両生爬虫類研究会、琉球大学などがあり、情報収集に心配はない。一方で北海道、東北、四国地方は研究者なども少なく、情報が少ない地方である。ただし、これらの学会では感染症関係の専門家が少なく、感染症に関する情報はあまり得られないと思われる。

④その他の外来生物問題

＜特定外来生物＞

・ウシガエルは依然として特定外来生物だということが知られていない。特にオタマジャクシに問題がある。ウシガエルのオタマジャクシすくいの例や子供による飼育の例などがあり、分布拡大を招いている。

・ウシガエルやアカミミガメの駆除の在り方については、地域別に検討してほしい。例えば都市生態系では環境教育的側面からウシガエルの駆除は望ましくない。一方で生態系影響が生じてはならない地区、例えば島嶼部や東北地方の未侵入地域などでは積極的に駆除を行ってほしい。以前は東北地方への定着は心配なかったが、地球温暖化の影響も考慮しなければならなくなった。クロサンショウウオとモリアオガエルが生息する池での報告例もある。

・オオヒキガエルはできだけ駆除することが望ましい。

・シロアゴガエルについては導入経路が明らかになったが、これ自体は駆除に効果があるわけではなかった。依然として在来種との競合の程度などは不明であり、研究を進めるべきである。

＜その他＞

・チュウゴクオオサンショウウオ（交雑個体を含む）が京都の賀茂川に生息している。在来種オオサンショウウオと交雑しており、深刻な状況である。

・捕獲されたチュウゴクオオサンショウウオについては、兵庫県の施設（日本ハンザキ研究所）に運んで飼育している。オオサンショウウオよりも活発で、餌のニジマスを追いかけて補食し、真冬でも採食する。脱走も試みるなどして、管理もたいへんである。

・賀茂川では、現在のところ、１匹ずつ捕獲してＤＮＡや酵素タンパクに基づいて種を鑑定し、中国産や交雑個体であれば飼育下に隔離するしかない状況である。

・もしも外来集団の根絶を目指すのであれば、あらかじめ純血のオオサンショウウオを捕獲して施設内に保護しておき、その上で、区間を決めて河川を順番に干し上げていくことで完全に排除できると考えられるが、これにはきわめて大きな労力を要する。

４）村田浩一 氏（日本大学生物資源科学部教授／野生動物医学会会長）

①両生類の感染症全般について

・行政は個々の感染症にこだわってそれらを追求して研究する傾向があるのではないか。本来行うべき固有種の保存に対する総合的な体制整備は遅れている。

・両生類が関係する感染症は多い。現在、国内ではカエルツボカビやラナウイルスだけが注目されているが、新興感染症に対応して在来種を保全していくためには、そうした感染症全てを対象にして、情報収集し警戒態勢を整えておく必要がある。

・現在北米では、寄生虫（条虫）が原因の奇形、発生異常等がカエル類に流行しているようだ。農薬などが複合的に作用すると症状が強く現れるのかもしれない。

・両生類は、農薬や酸性雨等の環境条件の影響を受けやすいため、環境指標生物（バイオマーカーもしくはインディケーター）として捉えることもできる。両生類の個々の種の保全も大事であるが、生態系全体の保全を視野に入れて、両生類の集団死に気を配っていくことが重要だろう。

②両生類の新興感染症への対応

・野生動物を管理することは不可能であり、すべての感染症を予防するのは難しい。そのため、感染症の発生を確認した後に、事例ごとに個別対応せざるをえない。

・カエルツボカビ症の緊急対応の際には、研究者や市民が協力し合ってよく対処した

と思う。当時は、獣医師同士のネットワークも構築されて機能していた。あの時点の対策としては、できるだけのことが実現できたのではないかと思う。環境省の対応は評価できる。

③「目に見えない外来生物」への対策

・情報収集が非常に重要だ。そのための関係者間ネットワークと早期警報システムの整備が必要だろう。

・へい死発生時に、その原因を特定し、対応を決定するコアセンターの整備も必要だ。このセンターで日常的に感染症モニタリングや感染症情報を収集しておけば、へい死の原因が感染症の場合、新興なのか再興なのかを判断することもできるだろう。

・日本国内には野生動物の疾病に関する中心的な研究機関が存在しない。そのような現状では、大学、一般市民、NPO 等でネットワークを構築し、協力していくしかないと思う。

・獣医学科のある大学間ネットワークは、早期警報システムやコアセンターの協力機関として使えると思う。大学間ネットワーク構築の際は、地域ごとに核となる大学を指定しておくのがよいだろう。ただし本来は、きちんとした組織もしくは施設を設置し、専任の研究者と情報処理の専門家を配置すべきであると考える。

・ＯＩＥ（国際獣疫事務所）では、家畜と野生動物の接触機会（インターフェイス）に注目しており、早期警戒の体制を世界中で構築しつつある。日本には、アジア地域のセンターとしての働きが期待されている。

・現場の方からの情報は有益な場合があるので、一般市民が気軽に連絡できる情報収集の媒体があった方がよい。アメリカの Wildlife Disease Information Node（http://wildlifedisease.nbii.gov/）、National Biological Information Infrastructure）及び Citizen Science（市民が科学研究に参加する取り組み http://www.birds.cornell.edu/citscitoolkit）などの仕組みは参考になるだろう。

・外国由来の新興感染症については、へい死発生後の対処作業以上に、事前のリスク管理が重要である。それにも関わらず、国内ではリスク評価があまり重要視されていない。

・外来の感染症については、侵入経路を把握し、問題地点に対して集中管理を行うことが有効だろう（例えば、人為移入［正規の輸入、密輸］、自然移入［渡り鳥］）。現在でも、正規に輸入されるものの中に、爬虫類寄生のダニ（哺乳類の脳炎を媒介する）、鳥類のマラリア原虫（高病原性の系統は野鳥に対して致死的）など、見過ごされている重要な寄生体や病原体がある。

④その他

・両生類を含む野生動物の疾病対策では、日本野生動物医学会は協力を惜しまない。

野生動物に詳しい学生会員も多数いるので、マンパワーとして活用できるだろう。

・獣医師会は大きな組織である。最近は「One World, One Health」という思想が、本学会の中に広がりつつある(http://www.oneworldonehealth.org/)。以前に比べて、野生動物の疾病を重視する気運は高まっているのではないか。

・全般的には、日本の研究者は、普及啓発を行うことの意識が低い。欧米の研究者は、比較的高い意識を持って一般市民への普及啓発を行なっている。

・自治体が、野生動物のへい死が発生した事実を隠そうとするのは、法的整備が遅れている現状では仕方がない面もある。それを踏まえた上で、最も適切で具体的な対策を構築しなければならない。

２．両生類の感染症に関する文献調査

カエルツボカビ症及びラナウイルス感染症は国際獣疫事務局（ＯＩＥ）の国際水生動物衛生規約（Aquatic Animal Health Code）に掲載され、動物（主に家畜）の移動に伴う感染症の拡大を監視、防止するための国際的な取り組みの対象となっている。この二つの疾病を中心に、両生類への影響が懸念される感染性疾病についての基礎的な情報、国内外での発生状況の情報等の収集を目的とし、平成22年度に出版された以下の５つの学術論文の文献を収集し、とりまとめを行った。

（１）野外調査における両生類の病原体暴露を最小限に抑えるために（資料１）

野外調査を行う研究者を対象として、その活動が感染症拡大に与えるリスク評価法を示したもの。現在までに出ている衛生ガイドラインをレビューしたもので、消毒等の具体的な対処方法から、それをどの範囲まで実施すべきかがわかるようになっている。

（２）国際獣疫事務局に通知義務のある感染症となった、両生類のツボカビ症とラナウイルス感染症：その評価（資料２）

二つの疾病がＯＩＥの国際水生動物衛生規約に記載されるようになった根拠の解説報告。国際取引に関する文献調査及びＯＩＥ加盟国へのアンケート結果をもとに、国際取引が感染症拡大に果たす役割、防止法、国際水生動物衛生規約記載の必要性などが解説されている。

（３）商取引における病原体の宿主交換、管理対応への提言（資料３）

アメリカで釣り餌用に広く売買されているトラフサンショウウオに感染するラナウイルスが魚類（オオクチバス）に感染することを示した報告。魚類が両生類のラナウイルス感染をさらに拡大させる可能性を示唆している。

（４）野生のヨーロッパアカガエル個体群におけるラナウイルス感染の長期的影響評価（資料４）

イギリスのヨーロッパアカガエルにおけるラナウイルス感染事例のレビューから、繰り返し死亡が発生している地点を抽出し、約 10 年後の調査結果と比較してラナウイルス感染による個体群の個体数への影響を示した報告。個体群規模が大きいほど個体数減少率も大きく、個体群の個体数変化とラナウイルス感染の有無に関連性が見られた。

（５）中国黒竜江省に生息する野生のチョウセンヤマアカガエルにおけるラナウイルスの広域分布（資料４）

中国の野生両生類におけるラナウイルス検出の最初の報告。黒竜江省ほぼ全域でＰＣＲ法によりチョウセンヤマアカガエルの成体と幼体のラナウイルス保有状況調査を行い、7 地域のうち６地域で陽性が確認された。成体では 5.7%が陽性であったが、幼体では 42.5%が陽性であった。長期的な調査が必要としている。

資料１

Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies

（レビュー：野外調査における両生類の病原体暴露を最小限に抑えるために）

A. D. Phillott, R. Speare, H. B. Hines, L. F. Skerratt, E. Meyer, K. R. McDonald, S. D. Cashins, D. Mendez, L. Berger, 2010, *Diseases of Aquatic Organisms,* Vol.92, pp175-185.

【要旨】

近年の両生類の世界的な集団死、減少、絶滅はツボカビ症のためとされている。ラナウイルス感染でも集団死が起きているが、個体数の激減や絶滅は起きていない。そのような状況下で、病気の感染や拡散をコントロールすることは非常に重要であり、特に人的関与の可能性があるところではそれは大切なことである。本論文では、野外環境において野生のカエルを扱う衛生ガイドラインの現状をレビューし、欠陥となりうる点を特定し、野外の状況に最も適切かつ効果的な衛生指針を提示した。それには、①ある地域内での個体間での感染を防ぐためのものと、②離れた地域間の個体群での感染を防ぐもの、の２通りがある。前者は両生類の詳細な取り扱い方法などを示している。後者では危険のレベル及び適切なリスク緩和戦略を決める手法を単純化、標準化するための数値化計算方法を示した。

現在、野生のカエル類の扱いに関する衛生ガイドラインはいくつかある（Daszak et al. 2001, NSW NPWS 2001, NWHC 2001, HACC 2004, Speare et al. 2004, Aguirre & Lampo 2006, CCADC 2008）が、互いに矛盾する内容もあり、両生類には危険な内容（例：手術消毒用ヨウ素製剤の使用）が書かれているものもある。これらを見直し、最善の方法を提示する。また地域間の感染防止措置実施の判断に関して、野外生物学者が自分達の活動による危険性が活動しない時と比較してどれだけ大きいかを判断し、個体群への危険性を判断できるようなリスク算出法を示した。このガイドラインは両生類に集団死を起こすことが知られているツボカビとラナウイルスを対象としているが、他の病原体にも有効と考えられる。

①地域内における衛生管理手段

個体間での感染の危険を減らすことを目指している。

野生両生類の捕獲、取り扱い、収容

ストレスは感染の可能性を大きくするため、可能な限り避けるべきである。

使い捨ての手袋（ラテックス、ニトリル、ビニール製）や使い捨てのビニール袋を用いる。オタマジャクシにはラテックスやニトリルで（時にはビニールでも）触られると死亡するものがあるが、事前に手袋を洗うことによって軽減することができるものもある。幼体の取り扱いは、その種に対する安全性がわかっている手袋を用いるべきである。ツボカビはヒトの素手で長く生存しないことが示されているが、何度も水で手を洗うとその殺菌効果は減少する。ラナウイルスがヒトの素手で生存可能かどうかはわかっていない。従って、リスクの高い種や場所では手袋の使用を勧める。それが不可能な場合は、扱う個体を変える度に70%のエタノールで洗浄して風乾させる。エタノールに60秒さらされれば、ほとんどの細菌、真菌、ウイルスは死滅する。しかしヒトの皮膚で何度も行うことは勧められない。70%エタノールがない場合は、最低限、生息地内の水で手を洗う。この方法では病原体を殺すことはできないが、暴露量は環境中濃度より特に大きくはならないと考えられる。しかしさらに試験する必要があり、この方法は低リスクの種を扱う際又は低リスクの場所で行う場合のみとする。

両生類を一時的に収容する場合は使い捨ての容器（ビニール袋など）又は使用毎に消毒した容器を用いる。成体は複数個体を一緒にしてはならない。同じ池、又は川の同じ部分から採集したオタマジャクシは短期間であれば一つの容器に保管しておいても良いが、個体数が過密にならないように注意する。また保管時間が時間（60分以上）になる場合は水を換え、24時間以上の場合は給餌する。種類によっては、捕獲や容器内の水の動きで傷つき易く、それがもとで感染しやすくなることがあるので注意する。野外調査でオタマジャクシを捕獲、収容する場合は、種毎のニーズに配慮して計画する必要がある。また、捕獲した個体を野外に戻す場合は、必ず同じ場所に戻す。

死体や症状を示している生体を扱う場合は、感染の危険性が高いと見なして徹底した衛生管理を取る必要がある。ツボカビ症の治療法は野外では有効例の報告はないが飼育下ではいくつかの方法－高温、イトラコナゾール（抗真菌薬）やクロラムフェニコール（抗生物質）－が示されている。これらは対象種や野外での治験など、さらに研究が必要である。ラナウイルスについては両生類の治療法は報告されていないが示唆はある。これらの治療法が確立すれば感染の危険性を下げるためにも用いることができるかもしれない。感染状況の把握、対策のために、死体や症状のある個体は回収すべきである。

侵襲的処置の前後の皮膚の消毒

標識再捕獲法による調査研究ではマーキングする際に衛生管理が必要である。

両生類の皮膚は透過性が高いので特殊な消毒薬が必要である。アルコールやフェノール、ヨウ素系の消毒薬は両生類の皮膚を乾燥や微生物から守っている粘液やワックスを破壊してしまう。また吸収されて全身的に毒性作用を示す可能性もある。唯一、市販品で適しているのはBactine スプレー（有効成分 0.14%w/w 塩化ベンザルコニウムと 2.6%w/w 塩酸リドカイン；非アルコール基剤）で、傷の治療に用いられたことがある。クロルヘキシジンも外科的処置の消毒には適している。カエル類の外科的処置にベタダイン（有効成分 1%ポビドンヨード）を勧める報告があるが、ヨウ素は一部の両生類に対して毒性があり、我々はポビドンヨード製剤の両生類に対する毒性が確定するまでは、その使用を勧めない。

外科的処置の前後の消毒は病原体が傷から感染する可能性を下げる。しかし両生類に適した消毒薬は水溶性で、捕獲地点で水に戻せばその効果は失われると考えられ、放す前にしばらく（例えば１時間ほど）は収容しておく必要がある。

カエル類のマーキング

指切りは指骨間関節で行うこと。野外で行う場合もハサミを 70%のエタノールで消毒する。埋め込みタグを付ける場合は使い捨てのアプリケーターを用いる。マーキングによる感染事例報告はないが、その影響評価についてはさらに調査研究が必要である。

傷口を塞ぐ時

指切りなどの後の傷口を塞ぐためには、大型種であればシアノアクリレート（手術用接着剤、商品名ベトボンド）を用いることができるが、小型種では難しい。埋め込みタグ挿入時の皮膚切開創を閉じるためにも用いることができる。水分は接着を妨害するため、放す前に傷口の接着を確認する必要がある。接着剤を使用する前に滅菌した吸収性包帯の小片を用いて水分を取り除くと良い。市販の急速接着剤は手術用接着剤よりも安価だが、動物の組織を壊死させた例があり、用いてはならない。接着剤は微生物を傷口内に閉じこめる留める可能性もあり、Bactine などで事前消毒すべきである。

用具の消毒

【表１】を参照。排水が水場に流れ込む場所で消毒薬を用いてはならない。消毒時には用具は乾燥させて、泥や有機物は除去しなければならない。次の調査地で使用する前に実施する。

②地域間の衛生管理手段

これは、ある地域への病原体の持ち込みや持ち出し、個体群間での感染の危険を防ぐことが目的である。野外生物学者は動物の生息地の間を簡単に、迅速に、そして自然界の障壁を越えて移動する。このため野生生物の感染症を地域間、個体群間に運ぶ危険性を避けるような対策を取ることが重要である。

地域間の感染防止のための衛生管理手段は厳重度のレベルで低・中・高と分けられる（【表２】参照）。これらは、感染を完全に防止することではなく、バックグラウンドレベルよりも感染の危険性が上がるのを防止することを目的としている。従って、野外生物学者が病原体を運ぶ危険性がバックグラウンドレベルに比較して高いかどうかを考慮する。さらに、対象種が希少種や絶滅危惧種であるかどうかといった、感染による影響の大きさも考慮する必要がある。また、衛生管理手段の適用範囲については、リスクが高い場合は厳重な対策を小規模な範囲で実施するが、リスクが低い場合は原重度の低い対策を広範囲で実施するというような、リスクに合わせた対策のレベルと適用範囲を提言したい（表４）。

これらの判断作業を単純化するために、リスク算出法を開発した。実際には多様な環境や調査があり、この方法は枠組みと見なして各事情に合わせて修正して使うのが良いだろう。算出にはまず、【表３】のリスク算定表で４つのリスクについて危険度を計算し合算する。そのトータル・リスクスコアに【表４】作業地域内の両生類の状況の影響スコアを乗算する。影響スコアはIUCNの保全状況評価（レッドリストカテゴリー）を反映したものである。こうして得られた総合リスクスコアを用いて、どのような厳重度の衛生管理手段をどの程度の適用範囲で実施すべきかを【表５】で確認する。総合リスクスコアの計算例を5つの例で示した（表６）。

結論

研究やモニタリング調査が病原体の感染や拡散に与える影響を数値化する手法について未だ詳細な研究がなされていない現状において、このガイドラインは野外調査地内及び調査地間における両生類への病原体暴露を最小限に抑えるために最も適切かつ効果的な方法を研究者達に提供するものである。ガイドライン改善のために、最善の衛生対策を取った結果の成功例、失敗例とも記録する必要がある。

本ガイドラインの地域間の衛生管理手段は、野外調査中に野生両生類への病原体の暴露を最小限に留める他に、両生類以外の種類の病原体（例えば植物の真菌病原体）や雑草の拡散を防止することにも役立つかもしれない。また、この衛生管理原則は、釣り人など他

の人を対象としたガイドラインや他の種類の生物の病原体のガイドラインなどにも応用できるであろう。

【表１】用具の消毒方法と対象病原体

適用	消毒薬	濃度	最低暴露時間	対象病原体
手術用具やその他の器具（定規やキャリパーなど）の消毒	塩化ベンザルコニウム	2mg ml	1分	ツボカビ
	エタノール	70%	1分	ツボカビ、ラナウイルス
捕獲用具や容器の消毒	次亜塩素酸ナトリウム（4%の次亜塩素酸ナトリウムを含むブリーチ）	1% 3%	1分 1分	ツボカビ ラナウイルス
	PathXか第4級アンモニウム化合物128	500分の1の希釈	30秒	ツボカビ
	Trigene	5000分の1の希釈	1分	ツボカビ
	F10	1500分の1の希釈	1分	ツボカビ
	ビルコン	2mg/ml	1分	ツボカビ
	〃	1%	1分	ラナウイルス
	Nolvasan	0.75%	1分	ラナウイルス
	過マンガン酸カリウム	1%	10分	ツボカビ
	完全乾燥		3時間以上	ツボカビ
	加熱	60℃	30分	ツボカビ、ラナウイルス
	加熱	37℃	8時間	ツボカビ
	殺菌用紫外線ライト		1分	ラナウイルスのみ
履物の消毒	次亜塩素酸ナトリウム（4%の次亜塩素酸ナトリウムを含むブリーチ）	1% 3%	1分 1分	ツボカビ ラナウイルス
	PathXか第4級アンモニウム化合物128	500分の1の希釈	30秒	ツボカビ
	Trigene	5000分の1の希釈	1分	ツボカビ
	F10	1500分の1の希釈	1分	ツボカビ
	完全乾燥		3時間以上	ツボカビ
布の消毒（バッグや衣類）	温熱洗浄	60℃以上	30分	ツボカビ、ラナウイルス

＊ツボカビについては Berger (2001), Johnson et al. (2003), Webb et al. (2007) により、ラナウイルスについては Langdon (1989), Miocevic et al. (1993), Bryan et al. (2009)による。

【表２】管理の厳重度と適用する衛生管理手段

厳重度	衛生管理手段
低	・用具や衣類を洗浄して乾かす
中	・両生類やその生息域に触れた用具は洗浄し消毒する ・両生類の生息地に乗り込んだ車両は汚れを落とす
高	・その地域専用もしくは使い捨ての用具を用いるか、又は両生類やその生息地と接触した全ての衣類と用具の徹底した洗浄と消毒 ・両生類の生息地に乗り込んだ車両は洗浄して消毒する

【表３】リスク算定表

リスク要素（RF）	基準	スコア
RF1：事前作業 (2-3 日前まで)	(a)在来でない両生類を扱った場合、また重大な感染症又はその可能性がある感染症にかかっている両生類を扱った場合､又は実験室で危険な両生類の病原体を培養した場合	100
	(b) 重大な感染症の病原体の存在が明らかな場所又はその状況がわかっていない場所において､外見上健康な両生類や水域環境を対象とした場合	10
	(c) 重大な感染症の病原体が存在しないことがわかっている場所において、外見上健康な両生類や水域環境を対象とした場合	7
	(d)両生類や水域環境を対象としていない場合	1
RF2：現地予定作業	(a)両生類や水域環境を取り扱う	10
	(b)両生類や水域環境を取り扱わない	1
RF3：現場までの距離（遠さ）	(a) 隔離されていてアクセスが難しい。人間の訪問も稀である（年間 100 人以下）	10
	(b)人間の訪問数は低い（年間 100－999 人）	7
	(c)人間の訪問数は中程度（年間 1000－9999 人）	3
	(d)人間の訪問数は高い（かなり撹乱されているか、又は人口が多い）	1
RF4：対象地における病原体の存在	(a) 重大な両生類感染症の病原体は存在しないか存在不明である	10
	(b) 重大な両生類感染症の病原体の存在が確認されている	5

【表４】影響スコアと基準：調査対象地の集水域における両生類の状況

基準	スコア
調査対象地の集水域に、	
(a)絶滅危惧Ｉ類種（CR）が少なくとも１種類は生息する、あるいは固有種が生息する	10
(b)絶滅危惧 II 類種（EN）が少なくとも１種類は生息する	8
(c)絶滅の危機がある種が少なくとも１種類は生息する	6
(d)絶滅の危惧が少しある種が少なくとも１種類は生息する	4
(e)在来もしくは外来の両生類が少なくとも１種類は生息する	3
(f)両生類は確実にもしくはおそらく生息しない	1

【表５】比較危険度による衛生管理手段のレベルと適用範囲

	高	中	低
総合リスクスコア	＞300	150－300	＜150
管理のレベル	厳格	中程度	低い
衛生管理手段の適用範囲	小規模な部分集水域ごと（水流次数１−2）	主な部分集水域ごと（水流次数３−4）	主要集水域ごと（水流次数５以上）

＊水流次数の定義は Strahler (1952)による

【表６】リスク算定表の適用例

シナリオ	RF1	RF2	RF3	RF4	トータル・リスクスコア	影響スコア	総合リスクスコア
1 大学院生が、感染状況が不明のボルネオの辺鄙な山中でカエルの種分化・固有性を調査する	10	10	10	10	40	10	400
2 外来のカエルを飼育している動物園飼育係が、疾病の発生が報告されていない都市部で、普通種のカエルのモニタリングを行う	100	10	1	10	121	3	363
3 外来のカエルを飼育していない一般からのボランティアが、上記の都市部のカエル調査を補助する	1	10	1	10	22	3	66
4 政府機関職員が、水泳に良く使われるが絶滅危惧種が生息する可能性がある国立公園の水場で、1回のみの両生類調査を行う	1	10	3	10	24	6	144
5 政府機関職員が、ツボカビ症の存在が知られており、訪問者が中程度の国立公園で、外見上健康な絶滅危惧種のカエル個体群の定期的モニタリングを行う	10*	10	3	5	28	8	224

*モニタリングの対象種にツボカビ症が認められれば、このスコアは 100 となる。

資料２

Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment

（国際獣疫事務局に通知義務のある感染症となった、両生類のツボカビ症とラナウイルス感染症：その評価）

Lisa M. Schloegel, Peter Daszak, Andrew A. Cunningham, Richard Speare, Barry Hill, 2010, *Diseases of Aquatic Organisms,* Vol.92, pp101-108.

【要約】

国際両生類評価（GAA）によると現在、世界の 43%の両生類の個体数が減っており、32%が絶滅の危機にある。近年の研究で、このような世界的な両生類の減少に関連してきたとされるのがラナウイルス感染症とツボカビ症である。その感染源として両生類の国際取引の関与が議論されてきたが、その関与の大きさについてはまだ議論が継続している。

これらの疾病の拡大、野生下あるいは飼育下の両生類に与える影響、両生類の生体や派生物の取引の影響について評価するために、2006 年にＯＩＥ（国際獣疫事務局）は国際水生動物衛生規約委員会に助言を与える目的で、4 名の国際的に評価の高い専門家から成る両生類の感染症に関する特別グループを結成した。特別グループの主な任務は、両生類の感染症に関する文献及び両生類の生体又は派生物等の国際取引による感染症の拡大の事実を

レビューすることであった。その結果、両生類の国際取引に関するＯＩＥ規約を作成するよう勧告した。本報告はそのレビュー結果の報告である。

文献調査結果から以下のことがわかった。両生類の国際貿易の規模は大きく、ペットや食用の他、釣り餌、実験動物、動物園展示用、バイオコントロールなどの目的のため輸出入される。そのルートの一つ一つが、両生類の感染症を広げる可能性を秘めている。食用のウシガエルの足は 2005 年に世界中で約 43 億円の売り上げがあり、米国魚類野生生物局のデータベースによると 2006 年だけで年間 456,299 個体の両生類生体が国境を越えて移動している。国外で養殖してアメリカに輸入されたウシガエルの調査ではツボカビもラナウイルスも検出されており、イギリスではツボカビ症の発生は感染した外来種のウシガエルと関連していた。他にアフリカツメガエルとオオヒキガエルも懸念の対象となる。また、近年、動物園等で増殖した個体の再導入が行われているが、マジョルカサンバガエルでは飼育下繁殖個体の再導入でツボカビ症を野生下に導入したようだとされている。ペットでは､日本では個人の所有していた 9 種の外来種の両生類でツボカビが検出された例がある。アメリカでは釣り餌として使われる両生類の取引の危険性が指摘されている。

さらに現状を把握するために、特別グループは両生類の生産・輸出入、病原体の存在に関するアンケートを作成し、ＯＩＥ加盟国に送付した。172 カ国中 69 カ国（40%）から回答があり、うち 45 カ国（65%）が両生類の取引を行っていると回答し、31 カ国が数値データを報告した。アンケート結果からは世界の両生類の生体の取引総数は、輸入で 1,577,128 匹 508,743Kg、輸出で 5,085,060 匹 321,317Kg であった（【表１】参照）。アンケートの回答率が低く、数値データのないものや他の貿易統計等と食い違うデータも多かった。このため、疾病感染のリスク評価のためには、両生類の国際取引について標準化したモニタリングシステムが必要と考えられた。取引個体から疾病検出の報告は 14 カ国からあり、うち 8 カ国は具体的にツボカビやラナウイルスの名称を挙げた。実際にこれらの病原体が存在する国はもっと多いと考えられる。回答した全ての国で感染症監視調査は実施されておらず、アンケートに疾病の報告をしなかった多くの国で疾病の存在は科学論文に報告されている。大部分の国は両生類の感染症についての規制を現在持っていない（【図１】参照）と回答した。また、ＯＩＥの付託権限を両生類疾病まで拡張すべきかの問いには、49 カ国（70%）がそれを支持する回答をした。

これらの結果を受けて特別グループはツボカビ症及びラナウイルス感染症を国際水生動物衛生規約に記載し、登録感染症（ＯＩＥに通知義務がある感染症）とすることを勧告し、2008 年 5 月のＯＩＥ総会で承認された。

両生類の生産や取引に関わる人々の多くは疾病の感染の危険性に気付いておらず、取引によるツボカビ症やラナウイルス感染症の拡大が壊滅的な影響をもたらすことを普及啓発

することは、世界的に疾病を管理していく上で重要なステップとなる。予防対策としては病原体が不活化されるような取り扱いをするか、バイオセキュリティの確保された生涯飼育施設に直送することになる。食用の場合はすぐに処理施設に隔離して病原体を不活化するような製品に加工し、廃水・容器等は廃棄前に消毒する。

輸出前に感染していないことが確認された場合は輸出国が国際水生動物健康証明書を発行することもできる。ペットや実験用、動物園展示の目的で輸入される際は検疫や個体の治療がなされるべきである。ツボカビ症の個体の治療にはいくつかの方法が報告されているが、大量の個体の治療法や食用の場合の安全性など、研究の余地がある。アメリカで食用に輸入され生体で市販されているウシガエルの 62%でツボカビが検出されたという近年の報告は、感染率の高さ、食用に適した治療法がないことなどを考慮すると、警戒すべき事態である。ラナウイルス感染症には現在、治療法がない。取引対象となっている種における感染率の調査がさらに必要である。さらに、ペットや動物園展示の目的で取引される両生類の多くは、未だに野生から捕獲されている。取り引されており、これらを扱う際には検疫、検査など、細心の注意と配慮が必要である。顧客にも産地を告げ、注意を促す必要がある。

これらの疾病についてはまだわからないことが多い。ツボカビでは感染実験で株により病原性が異なることが報告されている。病原体の感染様式や環境要因、動物側の状態などについては、さらに研究が必要である。ペット業界は両生類の貿易におけるツボカビ症の潜在的危険に次第に気付きつつあり、安全な飼育法の普及を図るなど対策はすでに開始されている。

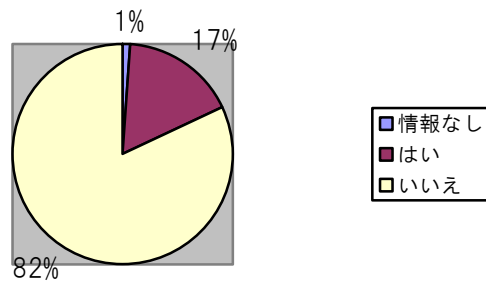
毎年、何百万という両生類が世界的に取引され、飼育下でも野生においても感染が発見されている状況で、感染症管理の方法が確立されていない現状では、早急な対応が求められる。リスク評価のために疾病の監視調査を国際規模で定期的に実施すべきである。感染個体の移動を監視するための厳重な検疫と監視調査プログラムを制定し、すべての国が適切な取り扱いができるようにする必要がある。更にＯＩＥの基準は、国際取引を通した両生類の感染症の拡大を軽減するための国家政策、国際政策を開発する際の基礎となるべきである。

【表１】生きた両生類の貿易状況（ＯＩＥメンバー国へのアンケート結果より）

地域	輸入		輸出		情報提供国数
	Kg	個体数	Kg	個体数	
アメリカ	0	429	204,190	3,150	5
アフリカ	0	1,084	0	0	3
ヨーロッパ	250,000	160,316	115,000	5,046	14
アジア、極東	258,743	1,409,699	2,127	5,073,364	6
中東	0	5,300	0	3,500	2
総計	508,743	1,577,128	321,317	5,085,060	30

【表２】両生類製品の貿易状況（ＯＩＥメンバー国へのアンケート結果より）

地域	輸入		輸出		情報提供国数
	Kg	個体数	Kg	個体数	
アメリカ	22,306	0	2,000	0	3
アフリカ	303	0	0	0	1
ヨーロッパ	3,598,212	0	358,300	0	8
アジア、極東	39,150	1,522	515,151	0	5
中東	1,000	0	0	0	1
総計	3,660,971	1,522	875,451	0	16

【図1】両生類感染症に関する規制の有無

資料３

Pathogen Host Switching in Commercial Trade with Management Recommendation

（商取引における病原体の宿主交換、管理対応への提言）

Angela M. Picco, Abraham P. Karam, James P. Collins, 2010, *EcoHealth,* Vol.7, No2, pp252-256.

【要約】

釣り餌用に取引されているトラフサンショウウオ（タイガーサラマンダー）にはラナウイルス感染が多く見られ、そこからアメリカ西部の野生個体群に感染が広がっているようである。ラナウイルスには両生類と魚類の両方に感染するものがあり、それらは例えば両生類のウイルスが魚類に感染すると魚類を宿主とするようになるような、宿主交換をすることが知られている。トラフサンショウウオに感染するラナウイルスは他の両生類に感染するものよりも淡水での釣りの対象となる魚類に感染するラナウイルスと近縁であることが知られており、過去に魚類とサンショウウオの間で宿主交換が起きたとする考え方を支持している。本報告では、釣り餌のトラフサンショウウオからオオクチバスに宿主交換が

起こるかどうかを確認するために、釣り餌として取引されているトラフサンショウウオのラナウイルスをオオクチバスに感染させる実験を行った。

ラナウイルスに感染していないオオクチバスの養殖個体群から 30 匹（2 週間の順化期間中に 1 匹死亡）を用いた。実験グループと対照グループに分け、実験グループの腹腔内にトラフサンショウウオから採取したラナウイルス 200 マイクロリットルを注入した。対照グループには同量の細胞培養液を注入した。10 日後に肝臓、腎臓、脾臓、浮き袋から組織を採取し、ＰＣＲ検査したところ、16 匹の実験グループのうち６匹がラナウイルス陽性で、対照グループ 13 匹はすべて陰性だった。病理組織学的解析では腎臓に壊死した細胞が見られるものもあったが、全ての組織は条虫の幼虫やミソゾアが多数寄生していたので、軽度の病変は隠されていた可能性がある。ラナウイルスの封入体は見つからず、壊死病変がウイルス感染のせいであるかどうかは明らかではない。

オオクチバスは感染したが、無症状で、死に至ることもなかったので、魚類が両生類ラナウイルスの無症状キャリアとなる可能性がある。あるいは、魚類でのラナウイルス感染は、他の魚や両生類にはうつさず、オオクチバスは最終宿主となっている可能性もある。このことを明らかにするためには更なる研究が必要である。さらに、腹腔内に注入する方法は自然界での感染方法と異なるものなので、自然界でトラフサンショウウオとオオクチバスの間で感染が起きているかどうかを確認するためには、体の接触や捕食などの直接接触や水浴感染など、自然の感染方法による実験も行う必要がある。

野生生物の商取引において宿主交換が起こる可能性があり、今回、取引個体に由来したウイルスが両生類から魚類に移った後でＤＮＡが回収できることが確認されたことを考慮すると、餌としての取引における宿主交換が懸念される。つまり餌となる両生類のラナウイルスが魚類に感染し、それが他の両生類やは虫類に感染させることができれば、感染は拡大する。感染した餌のトラフサンショウウオを魚のいる湖や野生個体群のいる所に放していることが知られている。

このような商取引によるウイルス感染拡大を防ぐためには、餌のサンショウウオ類の感染監視、消毒徹底、希少種生息地での餌としてのサンショウウオ類の使用制限、釣り人への普及啓発などが必要である。

資料４

Assessing the long-term impact of Ranavirus infection in wild common frog populations

（野生のヨーロッパアカガエル個体群におけるラナウイルス感染の長期的影響評価）

A. G. F. Teacher, A. A. Cunningham, T. W. J. Garner, 2010, *Animal Conservation* Vol.13, Issue 5, pp514-522.

【要旨】

両生類は世界的に減少しており、その原因の一つは感染症である。

イングランドでは、1980 年代から野生のヨーロッパアカガエルにラナウイルスによる集団死が発生している。ラナウイルス感染は北アメリカやカナダの両生類にも広がっており、そこにおいても集団死を引き起こしている。

ラナウイルスに伴う集団死の報告は多々あるが、この感染症の長期の影響について研究したものは未だない。本研究では、イギリスのヨーロッパアカガエルにおけるラナウイルスによると考えられる死亡事例の記録を調査した（70 カ所あり、うち 38 カ所が以下の調査対象)。

まず、アカガエル個体群は本疾病に対し複数の異なった反応を見せることが示された。すなわち一過性の場合、壊滅的となる場合、死亡発生が繰り返し起こり持続的な感染となる場合である。そこで死亡発生を繰り返す個体群（n=18）に焦点を当てると、1996 年から 2008 年までの成体個体数の平均減少率は 81%であった。非感染の対照グループ（n=16）は同時期の個体数に変化は見られなかった。

回帰分析では、小個体群より大規模個体群の方がより多くの個体数減少となりやすいことを示している。また個体群規模（個体数）の変化率と病気の有無は有意に関連しているものの、生息地の経過年数（長い方が環境の質が良いと考えられる）は個体群規模の変化において有意な影響はないということも明らかになった。

本研究は、おそらくラナウイルス感染由来であると考えられる長期に渡る地域的な両生類の個体数減少の、最初の証拠を提供するものである。

資料５

Broad Distribution of Ranavirus in Free-Ranging *Rana dybowskii* in Heilongjiang, China

（中国黒竜江省に生息する野生のチョウセンヤマアカガエルにおけるラナウイルスの広域分布）

Kai Xu, Dong-Ze Zhu, Ying Wei, Lisa M. Schloegel, Xiao-Feng Chen, and Xiao-Long Wang, *EcoHealth*, 2010, Vol.7, No.1, pp18-23.

【要約】

本レポートは中国の野生両生類におけるイリドウイルス科のウイルス（ラナウイルス）検出の最初のレポートである。ラナウイルスの感染のメカニズムは依然不明であるが、垂直感染、水平感染の両方が確認されている。近年の研究では、ラナウイルスの流行は温度と関係があることや人間による動物の移動が病気を広げていることなども明らかになって

いる。

　中国黒竜江省におけるラナウイルスの存在や感染率を確認するため、数が減少してきている野生のチョウセンヤマアカガエルをサンプリングした（註：調査年は記述されていない)。成体は１カ所 15 匹、１地域３カ所（川や池の岸の近くで、それぞれ互いに３㎞ずつ離れている)、７地域で合計 315 匹を採集し、黒竜江省におけるチョウセンアカガエルの分布域をほとんどカバーした。オタマジャクシは７地域のうちの４地域において１カ所 10 匹、１地域３カ所（おだやかな流れの川や自然の池）で、合計 120 匹をサンプリングした。成体は冬眠後の春に捕獲、幼体は夏に採集した。成体は麻酔下で肝臓をバイオプシー（生検）し、幼体は口部と尾部を除いた全身を破砕し、ＤＮＡ抽出を行った。

　ＰＣＲによる検査の結果、成体で 5.7%（315 匹中 18 匹)、オタマジャクシで 42.5%（120 匹中 51 匹）の感染が見られた。全体的に成体の感染率は低くオタマジャクシは高かった。７地域のうち、阿城を除く６地域から集められた個体でラナウイルス陽性が見られたが、それぞれの地域には未感染の場所もあった。(21 カ所の感染率には 0~90%と大きな幅があった。)

　本調査の結果、黒竜江省にラナウイルスが広がっていることが明らかになった。追加サンプリングと管理戦略の早急な作成が望まれる。また森林被覆率、人的撹乱、殺虫剤や除草剤の使用状況、天候や地理的な状況などの環境条件を記録し、ウイルスの感染率に影響があるかどうか、簡単に解析したが、大まかな推測値であり、影響評価のためにはより正確なデータを要すると考えられた。カエル類のウイルス感染率には年により変動があることが知られており、長期のモニタリングが必要である。また、他の地域、種類における調査も必要である。

３．カエルツボカビの世界分布予測

　平成 19 年度以降、環境省と独立行政法人国立環境研究所は連携して、カエルツボカビについて全国一斉調査を行ってきた。この調査で得られたデータを活用し、国立環境研究所の五箇公一氏のグループにおいて、カエルツボカビの世界的な分布についてＧＩＳ解析による生態ニッチモデリングが行われた。その研究の概要を以下に示す。

　＜要約＞

　　外来種の管理戦略を決定する上で、時空間的なリスクを評価することが重要な課題のひとつとされている。生息適地モデルは外来種がまだ侵入していない潜在的な生息可能地域を明確化し管理の重点地域を明示できるため、侵略可能性のリスクを評価するツールとして利用されている。外来種の場合、侵入地では原産地と異なる環境にも分布を拡大することが知られているため、原産地と侵入地両方の分布情報を利用することで生息

適地の推定精度は向上する。

両生類の感染症であるカエルツボカビは1998年に確認された新種の真菌類であり、世界的な両生類の激減に関わる要因のひとつに挙げられている。特に被害の大きい中南米を中心に、世界中のカエルツボカビの分布情報を用いた生息適地の解明が進められてきた。一方で日本のカエルツボカビは外国よりも遺伝的多様性が高く、在来の両生類は抵抗性を持っているため、本菌は日本では在来種である可能性が高い（Goka et al. 2009; Goka 2010)。そこで、原産地である日本と侵入地である外国の分布情報を用いてカエルツボカビの生息適地を明らかにし、より精度の高いカエルツボカビの空間的侵入リスクを評価した。

在データとして原産地日本でカエルツボカビが確認された40地点、侵入地外国で確認された205地点の計245地点を使用し（図1)、環境変数として5kmメッシュの年平均気温と気温の月変動係数を合成した第一主成分、最小月降水量と降水量の月変動係数を合成した第一主成分を用いた。そして spatial filter (Griffith, 2010) を環境要因と共に独立変数として加えることで空間的自己相関を考慮したモデルを、在データのみで解析できるニッチモデリングソフト MaxEnt (Phillips et al., 2006) を用いて解析した。侵入地の在地点の大部分は既存論文の情報を使用した。モデルの精度はAUC、空間的自己相関の強さは生息適地指数の残差のMoran’s I を用い、環境変数のみのモデルと環境変数に spatial filter を加えたモデルを比較した。

独立変数の貢献度は、環境変数のみのモデルは気温 PC1 (52.7、1.13SD)、降水量 PC1 (47.3、1.13SD) の順に高く、環境変数に spatial filter を加えたモデルでは気温 PC1 (12.8、2.18SD)、降水量 PC1 (9.1、1.68SD)、spatial filter (独立変数に加えた65個の合計：78.1、2.36SD) の順に高かった。気温、降水量の順で貢献度が高いことは、侵入地の在地点データのみを用いた世界分布予測の先行研究モデルの精度を示す AUC は、環境変数のみのモデルで0.81 (0.04SD)、環境変数に spatial filter を加えたモデルで 0.89(0.03SD)であった。また、空間的自己相関の強さを示す生息適地指数の残差の Moran’s I は、環境変数のみのモデルで0.44、環境変数に spatial filter を加えたモデルで0.31であった。spatial filter の導入により、モデルの精度は上昇し空間的自己相関は緩和した。

カエルツボカビの生息適地指数は在地点を中心に高くなった（図 2)。原産地である日本では沖縄から本州にかけて生息適地指数が高かった。侵入地では、とりわけ深刻な両生類の減少が報告されている中米、オーストラリアの生息適地指数が高かった。ブラジルの西部で最も生息適地指数が高くなったが、この地域は標準誤差が大きいため、指数の高さに関する信頼性は低いと考えられる。さらに、両生類の減少要因が不明とされている地域（Stuart et al 2004）の多くが本研究でカエルツボカビの生息適地指数が高かった地域と一致したため、両生類の減少の一部はカエルツボカビで説明できる可能性が高いことが示された。

図 1．使用したカエルツボカビの在地点

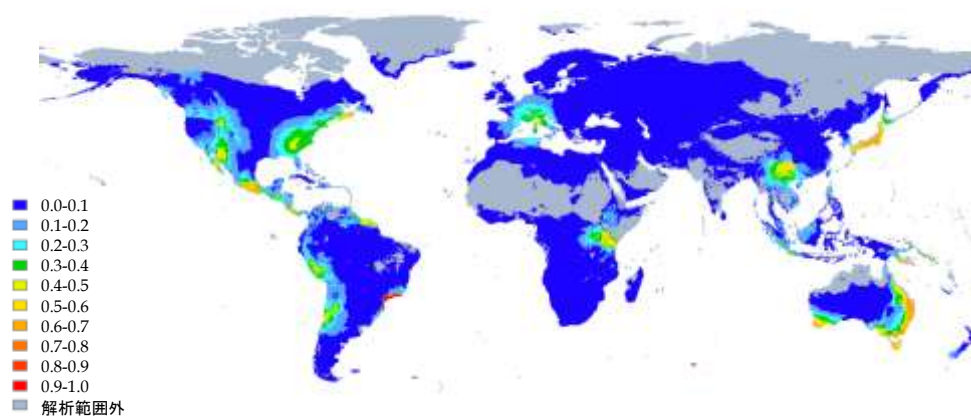



図 2．カエルツボカビの生息適地

第４章　両生類の感染症に関する知見の取りまとめ

平成 19 年度から平成 22 年度までの業務では文献調査や専門家へのヒアリング調査等を継続的に実施し、カエルツボカビ症やラナウイルス症について情報を集積してきた。また、それぞれの感染症においては、現地調査により、国内の両生類における感染状況を明らかにしてきた。

これらの知見に基づき、カエルツボカビ症とラナウイルス症が日本の両生類に与え得る影響に及びその軽減のために必要な措置について、以下の２つの方法で簡明な形でとりまとめ、一般者及び行政関係者向けに提供した。

１．普及啓発資料の作成

一般への普及啓発の資料として、カエルツボカビ症とラナウイルス症に関してこれまで環境省が収集してきた知見を取りまとめた。これらはウェブ掲載用の HTML ファイルとして保存した。

※http://www.env.go.jp/nature/intro/bd-kentou/index.html に掲載される予定。

２．両生類不審死・大量死発生時の対応マニュアルの作成

環境省の地方環境事務所等向けの資料として、これまでの業務によって集積された知見に基づき、両生類の大量死等が発生したときの対応を示した技術マニュアルを作成した。

引用・参考文献

Goka K., J. Yokoyama, Y. Une, T. Kuroki, K. Suzuki, M. Nakahara, A. Kobayashi, S. Inaba, T. Mizutani, A. D. Hyatt. (2009) Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. Molecular Ecology. 18:4757-4774.

Goka, K. (2010) Biosecurity measures to prevent the incursion of invasive alien species into Japan and to mitigate their impact. Revue scientifique et technique - Office international des épizooties 29: 299-310.

Griffith, D. A. (2010) Spatial autocorrelation and spatial filtering. Springer, Berlin.

爬虫類と両生類の臨床と病理のための研究会、日本野生動物医学会、日本生態学会・外来種専門委員会、日本爬虫両棲類学会、野生動物救護獣医師協会、日本動物園水族館協会、野生生物保全繁殖専門家グループ日本委員会(CBSG Japan)、世界自然保護基金ジャパン、日本自然保護協会、日本野鳥の会、生物多様性ＪＡＰＡＮ、日本鳥類保護連盟、山階鳥類研究所、日本両生類研究会、オオサンショウウオの会、NPO 法人どうぶつたちの病院（共同署名）．(2007) カエルツボカビ症侵入緊急事態宣言.

Hedrick, R. P., T. S. McDowell. (1995) Properties of Iridoviruses from ornamental fish. Veterinary Research 26:423-427.

Mao J., D. E. Green, G. Fellers, V. G. Chinchar. (1999) Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. Virus Research 63:45-52.

Phillips, S. J., R. P. Anderson, and R. E. Schapire. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. Ecological Modelling 190: 231-259.

Phillott, A. D., R. Speare, H. B. Hines, L. F. Skerratt, E. Meyer, K. R. McDonald, S. D. Cashins, D. Mendez, L. Berger. (2010) Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. Diseases of Aquatic Organisms 92:175-185.

Picco A. M., A. P. Karam, J. P. Collins. (2010) Pathogen host switching in commercial trade with management recommendations. EcoHealth 7:252-256.

Plumb J. A., J. M. Grizzle, H. E. Young, A. D. Noyes, S. Lamprecht. (1996) An iridovirus isolated from wild largemouth bass. Journal of Aquatic Animal Health 8:265-270.

Schloegel, L. M., P. Daszak, A. A. Cunningham, R. Speare, B. Hill. (2010) Two amphibian diseases, chytridiomycosis and ranaviral disease, are now globally notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE): an assessment. Diseases of Aquatic Organisms 92:101-108.

Schuh, J. C. L., I. J. Shirley. (1990) Viral hematopoietic necrosis in an angelfish (Pterrophyllum scalare). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 21:95-98.

Stuart, S., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodrigues, D. L. Fishman, and R. W. Waller. (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. Science 306:1783-1786.

Teacher, A. G. F., A. A. Cunningham, T. W. J. Garner. (2010) Assessing the long-term impact of *Ranavirus* infection in wild common frog populations. Animal Conservation 13:514-522.

Xu, K., D.-Z. Zhu, Y. Wei, L. M. Schloegel, X.-F. Chen, X.-L. Wang. (2010) Broad distribution of ranavirus in free-ranging *Rana dybowskii* in Heilongjiang, China. EcoHealth 7:18-23.

平成22年度

両生類の新興感染症実態調査業務報告書

平成23年3月

環境省自然環境局野生生物課

請負者：財団法人　自然環境研究センター

〒110－8676　東京都台東区下谷３－10－10

Tel. 03－5824－0960　Fax. 03－5824－0961